

**Identifizierung und funktionelle Analyse von
5' UTR-Spleissvarianten der mRNA des humanen Cathepsin L**

Abulizi Abudula

Dissertation zur Erlangung des akademischen Grades doctor rerum naturalium

der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

Identifizierung und funktionelle Analyse von
5' UTR-Spleissvarianten der mRNA des humanen Cathepsin L

vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität
Jena

von

Abulizi Abudula

aus

aus der Uygur Autonomen Region Chinas

Gutachter

- 1. Prof. Dr. Bernd Wiederanders (Jena)**
- 2. Prof. Dr. Marianne Jochum**
- 3. Prof. Dr. Claus Liebmann**

Tag des Rigorosums: 15. 07.2001

Tag der öffentlichen Verteidigung: 03.12.2001

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
1. Einleitung	3
1.1. Regulation der Genexpression durch Translationseffizienz	3
1.2. Regulation der Translation durch mRNA Stabilität	5
1.3. Regulation der Translation durch mRNA Spleissvarianten	6
1.4. Zielsetzung und Problemstellung	8
2. Material	11
2.1. Biologisches Material	11
2.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterial	12
1.3. Geräte	12
3. Methoden	13
3.1. Arbeiten mit tierischen Kulturzellen	13
3.2. Arbeiten mit <i>E. coli</i>	14
3.3. Isolierung der RNA und DNA	14
3.4. Analyse der Gesamt-RNA durch Polymerase Kettenreaktionen (PCR)	15
3.5. Klonierung von vollständigen hCATL cDNAs	17
3.6. Erzeugung von Genkonstrukten	18
3.7. Elektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA	20
3.8. RNase Protection Assay	21
3.9. Analyse der Gesamt-RNA durch Northernblot	22
3.10. <i>In vitro</i> Translation und Analyse der Cathepsin L cDNAs	23
3.11. <i>In vivo</i> Expression und Analyse des hCATL	23
3.12. Analyse der RNA-Stabilität	24

3.13.	GFP-Reportergen-Assay	24
4.	Ergebnisse	27
4.1.	Identifizierung einer neuen hCATL-Spleissvariante	27
4.2.	Charakterisierung der cDNA-Enden (mRNA-Enden) der Spleissvarianten durch RACE-PCR	29
4.2.1.	5'-RACE-PCR für hCATL-mRNA	29
4.2.2.	3'-RACE-PCR für hCATL-mRNA	32
4.3.	Gewebeverteilung der Spleissvarianten bei RT-PCR	32
4.4.	Semi-quantitative Darstellung der Spleissvarianten durch RNase Protection Assay	34
4.5.	Analyse der mRNA-Stabilität der hCATL-A und -A3 durch Northern Blot	38
4.6.	<i>In vitro</i> Translation der cDNAs der Spleissvarianten hCATL-A, -A2 und -A3	39
4.7.	<i>In vivo</i> Expression der vollständigen cDNAs von Spleissvarianten und quantitative Cathepsin L-Bestimmung durch ELISA	41
4.8.	Einfluss der verschiedenen 5'-UTRs von Spleissvarianten auf die Translationseffizienz des Grün-fluoreszierenden Proteins (GFP)	44
5.	Diskussion	50
	Literatur Verzeichnis	61
	Abkürzungen	
	Lebenslauf	
	Danksagung	

Zusammenfassung

Humanes Cathepsin L (hCATL) ist eine lysosomale Cystein-Protease und bei der Tumor-Invasion und -Metastasierung beteiligt. Die Expression des hCATL korreliert in vielen normalen Geweben und Tumorgeweben positiv mit der mRNA-Expression. Eine Ausnahme stellt das Nierenkarzinom dar, wo trotz erhöhter mRNA-Expression der hCATL-Proteingehalt erniedrigt ist. Um dieses Missverhältnis in malignen Nierentumoren gegenüber gesundem Nierengewebe zu klären, wurden in der vorliegenden Arbeit die Spleissvarianten der hCATL-mRNA kloniert und charakterisiert.

Durch die Klonierung vollständiger hCATL-cDNAs und durch die Analyse mit 5'- bzw. 3'-RACE-PCR (RACE: *rapid amplification of cDNA ends*) sowie durch den RNase Protection Assay wurde gezeigt, dass von den bisher beschriebenen vier Isoformen der hCATL-mRNA nur zwei tatsächlich *in vivo* vorkommen. Diese entsprechen den alternativen Spleiss-Formen hCATL-A und -A2. Darüberhinaus wurde eine neue, besonders kurze und *in vivo* dominierende Form der hCATL-mRNA gefunden, die hier als hCATL-A3 bezeichnet wurde. Diese drei Formen unterscheiden sich in der 5'-nicht-translatierten Region (5'-UTR). Das alternative Spleissen findet ausschliesslich im Exon 1 des hCATL-Gens statt. Das 278 nt grosse Exon 1 ist bei der Form hCATL-A zwar noch komplett, jedoch bei der hCATL-A2 bzw. hCATL-A3 Variante jeweils auf 188 nt bzw. 132 nt verkürzt.

Durch RT-PCR und RNase Protection Assay wurde gezeigt, dass die neue Spezies hCATL-A3 in den untersuchten Geweben und Zellen dominiert und bis zu viermal so stark exprimiert ist als die Varianten hCATL-A bzw. -A2. Im Verhältnis der einzelnen Varianten untereinander war kein Unterschied zwischen Nierentumorgewebe und normalem Nierengewebe sowie gegenüber anderen Geweben zu finden. Darüber hinaus zeigte die Analyse der mRNA-Halbwertszeit (Stabilität) durch Northern Blot nach RNA-Synthesehemmung, dass die Formen hCATL-A und -A3 keinen Unterschied in der mRNA-Stabilität haben.

Die Analyse der Translationsrate der drei natürlich vorkommenden Spleissvarianten hCATL-A, -A2 und -A3 bzw. des Einflusses ihrer 5'-UTRs auf die Translationseffizienz wurden sowohl *in vivo* als auch *in vitro* durchgeführt. Durch einen *in vitro* Translationsassay mit Kaninchen Retikulozytenlysat konnte gezeigt werden, dass nicht nur die Translationsprodukte in der Grösse der bekannten hCATL-Präproenzym entsprachen, sondern auch, dass die verschiedenen hCATL-mRNAs *in vitro* mit unterschiedlicher Rate translatiert wurden. Dabei wurde die kürzeste Spleissvariante (hCATL-A3) viel effizienter translatiert als die anderen beiden.

Die transiente Expression der HEK293- bzw. BHK21-Zellen mit drei vollständigen hCATL-cDNAs und die Bestimmung der hCATL-Expression mit dem hCATL-ELISA zeigte, dass dieser Unterschied der Translationsrate *in vivo* signifikant und noch deutlicher war, als bei der *in vitro* Translation. Dabei konnte die kürzeste Variante hCATL-A3 bis zu 3-fach effizienter translatiert werden als die anderen beiden. Die hCATL-A und -A2 wiesen keinen Unterschied bei der Translationsrate *in vitro* und *in vivo* auf. Dies kann darauf hinweisen, dass eine Sequenz, welche in der 5'-UTR der hCATL-A3 mRNA fehlt, zu reduzierter Effizienz bei der Translation der längeren Varianten hCATL-A und -A2 führt.

Um diese Aussage genauer zu überprüfen, wurden d2EGFP (*destabilized enhanced green fluorescent protein*) Reportergen-Konstrukte mit verschiedenen 5'-UTRs bzw. verschiedenen

Teilen der 5'-UTR hergestellt, und diese Konstrukte wurden in HEK293-Zellen transient exprimiert. Dieser Reportergen Assay konnte bestätigen, dass im Bereich von Nukleotid 132-188 der hCATL-A und -A2 mRNA ein bislang unbekanntes *cis*-agierendes Element vorhanden sein könnte, das die Translation negativ beeinflusst. Gewebe-/ Zell-spezifische Translationsfaktoren könnten mit diesem Element interagieren und die gewebespezifische Expressionsregulation des hCATL-Proteins in den Nierentumoren verursachen.

1. Einleitung

Bei Eukaryoten wird die Genexpression auf sehr vielfältige Weise reguliert. Neben der Regulation der Transkription ist die messenger RNA (mRNA) ein Schlüsselmolekül für eine weitere Regulationsebene, die posttranskriptionelle Regulation. Spezifische Sequenzen der mRNA, wie z.B. das AUUUA Sequenzmotiv, sind dafür verantwortlich, wie schnell die mRNA in der Zelle abgebaut wird (Jacobs et al., 1996; Linz et al., 1997); andere Sequenzmotive bzw. Sekundärstrukturen können bis zu einem gewissen Grad bestimmen wie effizient diese mRNA translatiert werden kann (Kozak, 1991; Paraskeva et al., 1999). Aus einem RNA-Vorläufer werden auch durch alternatives Spleissen verschiedene mRNA-Varianten entstehen, die bei der Regulation der Genexpression während der Entwicklung unterschiedliche Rolle spielen (Lopez, 1998). Auch Spleissvarianten, die keinen Einfluss auf die Proteinstruktur haben, können unterschiedliche Nutzbarkeit oder Stabilität der mRNA bestimmen, indem entweder verschiedene 5'- bzw. 3'-UTR Sequenzen verwendet werden.

Da sich die vorgelegte experimentelle Arbeit mit der physiologischen Funktion verschiedener mRNA-Spezies für die lysosomale Cystein Protease Cathepsin L befasst, soll einleitend auf einige Aspekte der posttranskriptionellen Regulation der Genexpression eingegangen werden.

1.1. Regulation der Genexpression durch Translationseffizienz

Verschiedene mRNA's können mit unterschiedlicher Effizienz translatiert werden. Diese Translationsrate kann durch *cis*-agierende Struktur-Elemente wie z.B. eine Haarnadelstruktur in der 5'-UTR reguliert werden (Paraskeva et al., 1998). Die Wechselwirkung verschiedener *cis*-agierender Struktur-Elemente mit Translationsfaktoren oder *trans*-agierenden Faktoren führen dazu, dass die Gene, deren mRNA's solche Sequenzen besitzen, in bestimmten Geweben oder in einer bestimmten Entwicklungsphase der Zelle zur Verfügung stehen (Jacobs et al., 1996; Menotti et al., 1998).

Für die meisten mRNA's ist die Initiation eine limitierende Phase bei der Translation. Deshalb hängt die Translationseffizienz meistens von der Initiationsrate ab. Die Effizienz der Translation wird von verschiedenen Strukturen in der mRNA beeinflusst. Dazu zählen die *Cap*-Struktur, die Länge der 5'-UTR, die Sekundärstruktur der 5'-UTR, stromaufwärtsliegende Offene-Leserahmen der 5'-UTR (*upstream open reading frames*-uORFs), Umgebung des Initiationscodons (Initiator) und poly(A)-Schwanz.

1.1.1. „Cap“-Struktur

Die Bedeutung der „Cap“-Struktur für die Translationsinitiation wurde sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt (Gallie, 1991; Preiss and Hentze, 1998). In Eukaryoten bestimmt die „Cap“-Struktur (7mGpppN) die Qualität und Quantität des Translationsprodukts. Die „Cap“-Struktur kann die Frequenz der Translationsinitiation an einer mRNA stark stimulieren und die 43S ribosomale Untereinheit an das 5'-Ende der mRNA rekrutieren. Damit wird das richtige Startcodon in der Nähe vom 5'-Ende aufgefunden (Sachs et al., 1997).

1.1.2. Länge der 5'-UTR (Leadersequenz)

Es gibt zwar keine strenge Korrelation zwischen der Länge der „Leadersequenz“ und der Effizienz der Translationsinitiation, jedoch führt eine extrem verkürzte „Leadersequenz“ zu

drastisch reduzierter Translationseffizienz (Kozak, 1991). Für eine effiziente Translationsinitiation ist eine minimale Distanz von 25 Nukleotiden zwischen der „Cap“-Struktur und dem Initiator AUG (Startcodon) in Hefe notwendig. Bei einem zu geringen Abstand zwischen der „Cap“-Struktur und dem Startcodon AUG kann das Ribosom das AUG nicht mehr erkennen (Yoon and Donahue, 1992).

1.1.3. Sekundäre Struktur der 5'-UTR

mRNA's ohne stark angeprägte Sekundärstruktur in der 5'-UTR können besser translatiert werden als die mit einer solcher Sekundärstruktur. Eine „Haarnadelstruktur“, die sich in der Nähe der „Cap“-Struktur befindet, hat einen störenden Effekt auf die Bindung der 43S ribosomalen Untereinheit an das 5'-Ende der mRNA und kann deshalb die Translation hemmen. Eine weiter stromabwärtsliegende Haarnadelstruktur kann die Effizienz der Translations ebenfalls drastisch reduzieren, da sie den „scanning“-Prozess hemmt, nämlich die Bewegung der 43S ribosomalen Untereinheit entlang der 5'-UTR auf der Suche nach dem Startcodon (Pelleitier und Sonenberg, 1985; Goossen et al, 1990; Koloteva et al., 1997). In diesem Zusammenhang ist die translationale Repression einiger mRNA's durch das *iron responsive element* (IRE) und sein spezifisches zytoplasmatisches Bindungsprotein, *iron regulatory protein* (IRP), sowohl *in vivo* (Theil, 1990; Goossen et al., 1992; Menotti et al., 1998) als auch *in vitro* (Paraskeva et al., 1999) ausführlich untersucht worden. Die 5'-UTR der Ferritin-mRNA enthält ein IRE-Sequenzmotiv von 35 Basen. Dieses IRE bildet eine Haarnadelstruktur und bindet dort ein 87 kDa grosses IRP-Protein. In den mRNA's, die Proteine kodieren, welche bei einem hohen Niveau von Eisenionen in der Zelle benötigt werden (wie z.B. die mRNA von Ferritin oder der mitochondrialen Aconitase), befindet sich diese Sequenz in ihrer 5'-UTR. Bei niedriger Konzentration von Eisenionen hat das IRP eine hohe Affinität zur Haarnadelstruktur des IRE-Sequenzmotivs und bindet alle mRNA's, deren Translationsprodukte Eisenionen enthalten oder transportieren. Damit wird ihre Translation blockiert, und es wird kein oder nur sehr wenig Protein synthetisiert. Wenn das Niveau an Eisenionen steigt, verliert das IRP seine Affinität zur IRE-Sequenz und kann nicht mehr daran binden. Die mRNA's (wie z.B. von Ferritin) werden effizient translatiert (Thomson et al., 1999).

Anders als die Sekundärstrukturen, die den „scanning“-Prozeß der Ribosomen bei der Translation hemmen können, wirken Sekundärstrukturen, welche als *internal ribosomal entry site* (IRES) bezeichnet werden. IRES ist ein Sequenzmotiv in der 5'-UTR und sein Sekundärstruktur enthält die Bindungsstelle für die kleine ribosomale Untereinheit (43S). Damit kann IRES die Translationsinitiation unabhängig von der „Cap“ Struktur starten und die Translationseffizienz der uORFs sehr stark erhöhen (Macejak and Sarnow, 1991; Oumard et al., 2000).

1.1.4. Stromaufwärtsliegende Offene-Leserahmen (uORF)

Die 5'-UTR einiger mRNA's in eukaryotischen Zellen enthalten stromaufwärtsliegende (*upstream*) Offene-Leserahmen (uORFs). Dem „scanning“-Modell nach startet die Translation dieser mRNA's am ersten AUG des uORFs und wird dann am Stopcodon des uORFs terminiert. Die Translation des Haupt-ORFs erfolgt dann nur im Fall einer *re-initiation* oder durch „leaky scanning“ nämlich bei Nicht-Erkennen des ersten AUGs durch das Ribosom. Ein „leaky scanning“ findet dann statt, wenn das AUG-Startcodon des uORFs zu dicht am 5'-Ende (zweites AUG) der mRNA lokalisiert ist, um eine effiziente Initiation der Translation an diesem ersten

AUG zu erlauben. Daraus geht hervor, dass ein uORF einen starken hemmenden Effekt auf die Translation des stromabwärtsliegenden Haupt-ORF haben kann (McCarthy, 1998).

1.1.5. Umgebung des Initiationskodons (Initiator)

Für die meisten eukaryotische mRNA's beginnt die Translation am AUG, das in der Nähe von 5'-Ende liegt. Die umliegenden Nukleotide wirken hierbei an der Erkennung dieses AUGs mit. In Säugerzellen ist die Konsensus-Sequenz GCCACCAUGG (Kozak-Sequenz) als das stärkste Signal für die Translationsinitiation beschrieben worden (Kozak, 1987). Wenn in der Umgebung die Kozak-Sequenz fehlt, überspringt das Ribosom das AUG und initiiert die Translation am weiter stromabwärtsliegenden AUG entsprechend dem Modell des "leaky scanning" (Futterer and Hohn, 1996; Kozak, 1999).

1.1.6. 3'-(OH) poly(A)-Schwanz

mRNA's mit poly(A)-Schwanz können wesentlich effektiver translatiert werden als mRNA's ohne poly(A)-Schwanz. Eine noch deutlichere Stimulation der Translation erfolgt, wenn die mRNA sowohl poly(A)-Schwanz als auch „Cap“-Struktur besitzt (Iizuka et al., 1994; Preiss and Hentze, 1998). Analysen *in vitro* und *in vivo* wiesen darauf hin, dass die poly(A)-Enden am Prozess der Translationsinitiation beteiligt sind (Tarun and Sachs, 1996; Le et al., 1997). Der poly(A)-Schwanz stimuliert die Rekrutierung der 43S Untereinheit an die mRNA durch die Wechselwirkung des poly(A)-Bindungsproteins (PABP) mit eukaryotischem Initiationsfaktor 4G (eIF4G). Eine synergistische Wechselwirkung des poly(A)-Schwanzes mit der „Cap“-Struktur bei der Translationsinitiation wurde vermutet, da die beiden das gemeinsame Zielprotein eIF4G binden können (Jacobson et al., 1996; Sachs et al., 1997).

1.2. Regulation der Translation durch mRNA-Stabilität

Die Expressionsrate eines eukaryotischen Genes hängt nicht nur von der Translationseffizienz der mRNA ab, sondern wird auch durch die Abbaurate der mRNA in der Zelle bestimmt. Die mRNA-Stabilität (Halbwertszeit, *turn-over*) kann einen grossen Einfluss auf die Expression individueller Gene in der Zelle haben, denn die Abbauraten verschiedener mRNA's variieren sehr stark mit bis zu 100 fachen Unterschieden in der biologischen Halbwertszeit von ~15 min (einige Onkogene wie z.B. myc, fos) bis zu 24 Stunden (Beelman and Parker, 1995; Jacobson and Peltz, 1996). Die Regulation des mRNA-Abbaus ist somit ein wichtiger Mechanismus für die Regulation der Genexpression (Li et al., 1997; Wilson et al., 1997; Ing and Ott, 1999; Staton and Leedman, 1998; Bourgeois et al., 1997).

In der 3'-UTR der meisten kurzlebigen mRNA's sind häufig spezifische AU-reiche Sequenzen vorhanden, die eine mRNA destabilisieren können. In diesem Zusammenhang sind Zytokine, Lymphokine und Onkogene untersucht worden, deren mRNA-Stabilität durch die Wirkung von mRNA-Bindungsproteinen (RBP) reguliert werden, welche an das AU-reiche Sequenzmotiv in der 3'-UTR binden (Laterza et al., 1997; Jacobs et al., 1996; Tang et al., 1997). Wenn dieses AU-reiche Sequenzmotiv in andere 3'-UTR's, wie z.B. in die Globulin-mRNA eingefügt wird, die normalerweise sehr stabil sind, werden diese mRNA's bis zu 30 mal schneller abgebaut (Shaw and Kamen, 1986). Darüber hinaus können manche Hormone die Genexpression dadurch beeinflussen, daß sie die Modifikation des RBPs induzieren und die Bindungsaffinität an die mRNA ändern (Staton and Leedman, 1998; Ing and Ott, 1999).

1.3. Regulation der Translation durch mRNA-Spleissvarianten

Häufig wird die Expression eines Gens durch ein sogenanntes alternatives Spleissen reguliert. Dabei können verschiedene mRNA-Spleissvarianten aus einer einzigen RNA-Vorläufer (Prä-RNA) entstehen. Diese Varianten können sich sowohl in ihrer Translationseffizienz, in ihrer Stabilität als auch in ihrem Translationsprodukt unterscheiden. Alternatives Spleissen ist oft Zell- und Gewebe-spezifisch. Hierdurch kann die biologische Wirkung eines Gens Zell- und Gewebespezifisch stark variiert werden. Da sich die vorgelegte Arbeit mit Spleissvarianten der mRNA für das humanen Cathepsin L (hCATL) beschäftigt, soll im weiteren zunächst näher auf den Spleissvorgang eingegangen werden.

1.3.1. Kontrolle des Spleissens

Bevor eine mRNA vom Zellkern ins Zytosol transportiert wird, werden Introns präzise aus der mRNA-Vorläufer entfernt. Diese Aufgabe wird durch einen grossen Ribonucleoprotein-Komplex ausgeführt, nämlich das Spleissosom, das aus vier kleinen Ribonucleoprotein Partikeln (U1, U2, U5 und U4/6 snRNPs) und zahlreichen anderen Proteinen besteht. Die snRNPs enthalten wiederum fünf kleine Kern-RNAs (U1, U2 U4, U5 und U6 snRNA, *small nuclear RNA*), die bis zu 300 Nucleotide umfassen (Will and Lührmann, 1997). Die mRNA-Vorläufer enthält konservierte Intronsequenzen, an denen das Spleissosom und andere Spleissfaktoren binden und die Spleissreaktion einleiten. Diese Konsensus-Sequenzen des Introns sind ein Octanukleotid an der 5'-Spleissstelle und ein Polypyrimidinrest an der 3'-Spleissstelle sowie die Verzweigungsstelle, die zwischen 20 und 50 Nucleotide stromaufwärts von der 3'-Spleissstelle liegt (Moore et al., 1993; Burge et al., 1999).

Neben snRNP's und konservierten Spleissstellen werden noch weitere Strukturkomponente für das konstitutive Spleissen benötigt. Die spezifischen Sequenzen der Spleissstellen in höheren eukaryotischen mRNA-Vorläufer's sind nicht immer hoch konserviert. In ihrer Umgebung sind häufig viele kryptische Spleissstellen vorhanden, die normalerweise nicht benutzt werden. Darüber hinaus besitzen viele mRNA-Vorläufer alternative Spleissstellen, deren Erkennung während der Regulation der Genexpression notwendig ist (Wang and Manley, 1997; Lopez, 1998).

Aus den obengenannten Gründen scheinen zusätzliche *cis*-agierende Struktur-Elemente und *trans*-agierende Faktoren notwendig zu sein, um geeignete Paare von 5'- und 3'-Spleissstellen präzise auszuwählen. Tatsächlich sind viele exonische und intronische *cis*-agierende Sequenzen identifiziert worden, die die Selektion der Spleissstellen sowohl *in vivo* als auch *in vitro* beeinflussen können, darunter Spleiss-*Enhancer* (Coulter et al., 1997; Tian and Kole, 1995; Schaal and Maniatis, 1999) und Spleiss-*Silencer* (Del Gatto and Breathnach, 1995; Staffa and Cochrane, 1995; Carlo et al., 2000). Bisher ausführlich charakterisiert worden sind die exonischen Spleiss-*Enhancer* (Adams et al., 1996; Hertel et al., 1997; Dominiski and Kole, 1994; Tanaka et al., 1994; Watakabe et al., 1993; Cote, et al., 1999). Spleiss-*Enhancer* sind purinreiche kurze RNA-Sequenzen. Sie befinden sich meistens innerhalb von Exons, die stromabwärts einer schwachen 3'-Spleissstelle liegen, und können ihre Wirkung über Entfernungen von bis zu 500 Nukleotiden ausüben (Selvakumar and Helfman, 1999; Bourgeois et al., 1999).

Spleiss-*Enhancer* werden meistens nicht durch snRNP's, sondern durch eine andere Gruppe von konsitutiven Spleissfaktoren erkannt. Diese werden SR-Proteine genannt, da sie eine spezifische

Arginin-Serin-Dipeptid wiederholende Sequenz-Domäne (RS Domäne) besitzen (Valcarcel and Green, 1996; Manley and Tacke, 1996; Blencowe et al., 1999). Ein SR-Protein enthält ein bis zwei RNA-Erkennungsmotive am N-terminalen Teil und eine phosphorylierte RS-Domäne in der Carboxy-terminalen Region. Wichtige Mitglieder dieser Familie sind SF2/ASF (SRp30a), SRp40, SRp55, SRp75, SRp20, 9G8 und SC35 (SRp30b). Während des Spleissens interagieren SR-Proteine sowohl miteinander als auch mit snRNP-assoziierten Proteinen mittels der phosphorylierten RS-Domäne (Wu and Maniatis, 1993; Kohtz et al., 1994; Xiao and Manley, 1998).

Die essenzielle Funktion der SR-Proteine ist, das Erkennungssignal einer schwachen Spleissstelle zu verstärken, indem sie ein stromabwärts liegendes Exon-Spleiss-Enhancerelement binden. SF2/ASF interagiert zunächst mit der mRNA-Vorläufer und rekrutiert die U1-snRNP auf der 5'-Spleissstelle, um den Prä-Spleissosom-Komplex zu bilden (Staknis and Reed, 1994; Kohtz, et al., 1994). Während der Entstehung des reifen Spleissosom-Komplexes wird eine Brücke über Exons und Introns gebildet. Dabei interagieren die SR-Proteine sehr wahrscheinlich mit dem an die 5'-Spleissstelle gebundenen U1-snRNP und dem an die 3'-Spleissstelle gebundenen U2AF Faktor. Bei *in vitro* Assays benötigt der katalytische Schritt des Spleissens verschiedene SR-Proteine, deren Abwesenheit die Bildung des Spleissosoms blockiert (Zahler et al., 1992).

1.3.3. Alternatives Spleissen

Alternatives Spleissen der mRNA-Vorläufer ist weit verbreitet und kommt in verschiedenen Genen und Geweben von vielen Organismen vor. Durch alternatives Spleissen kann die Genexpression verschiedenartig zellspezifisch reguliert werden: erstens durch die Produktion von funktionellen oder nicht-funktionellen Proteine (Snyder et al., 1999; Kotera et al., 1999; Kone and Higham, 1998); zweitens durch die Gestaltung mehrerer Proteinisoformen (Keppler and Sloane, 1996; Kawahara et al., 2000; Strehler and Zacharias, 2001); drittens durch verschiedene mRNA-Isoformen mit verschiedenen nicht-translatierten Regionen, die auf die Translation unterschiedlichen Einfluss haben können (Mariottini et al., 1999; Djali et al., 1998); viertens durch die zellspezifische Expression verschiedener Proteine, die durch ein Gen kodiert werden.

Alternatives Spleissen findet meistens nur an einem von beiden Enden des Introns statt. Dabei wird die nahe liegende alternativ gespleisste Stelle als „proximal“ und die weit entfernt liegende alternative Spleissstelle als „distal“ bezeichnet.

SR-Proteine spielen neben dem konstitutiven Spleissen auch beim alternativen Spleissen eine wichtige Rolle (Manley and Tacke, 1996; Bourgeois et al., 1999). SF2/ASF begünstigt die Wahl einer proximalen 5'-Spleissstelle bei höherer Konzentration und bevorzugt eine distale 5'-Spleissstelle bei niedriger Konzentration (Eperon et al., 2000; Cote et al., 1999). Beim alternativen Spleissen an der 3'-Spleissstelle begünstigt SF2/ASF ebenfalls eine proximale.

Die hnRNPs (*heterogeneous nuclear ribonucleoprotein*) gehören zu einer anderen Gruppe von Spleissfaktoren, die auch als alternative Spleissfaktoren bezeichnet werden (Dreyfuss et al., 1993), und umfassen hnRNP A1, B, C, K usw. Anders als SF2/ASF und SC35 kann hnRNP A1 bei höherer Konzentration oder transienter Überexpression die Selektion der proximalen 5'-Spleissstellen hemmen und die Selektion der distalen 5'-Spleissstellen begünstigen (Bai et al., 1999). hnRNP A1 kann ähnliche und verborgene Spleissstellen mit höherer Affinität binden und antagonistisch zu den SR-Proteine wirken (Burd und Dreyfuss, 1994; Cáceres und Krainer, 1997;

van Oordt et al., 2000). Dabei reduziert hnRNP A1 die Affinität der U1-snRNP für die proximale 5'-Spleissstelle und begünstigt die Bindung an der distalen 5'-Spleissstelle.

Solche antagonistische Effekte zwischen hnRNP A/B-Proteinen und SR-Proteinen können als wichtige Mechanismen in der Zelle dienen, um das alternative Spleissen zu regulieren. Auf diese Weise können einzelne Kombinationen dieser Proteine, manchmal auch im Zusammenwirken mit anderen genspezifischen Regulatoren, das alternative Spleissen in verschiedenen Geweben in einzelnen Entwicklungsphasen oder besonderen metabolischen Stadien der Zelle regulieren.

1.3.4 Regulation der Genexpression durch Spleissvarianten

Verschiedene alternative Spleissvarianten, die nach den oben beschriebenen Mechanismen entstehen, können mit unterschiedlicher Rate translatiert werden, unterschiedliche Stabilität aufweisen oder verschiedene verkürzte (*truncated*) Proteinformen bilden, die wiederum unterschiedliche Funktionen zeigen (Svineng et al., 1998). Bestimmte Spleissvarianten können auch durch den Transkriptionsstart an alternativen Promotoren und nachfolgendem konstitutivem Spleissen entstehen (Brewer et al., 1999; Huang et al., 1999). Die meisten Spleissvarianten stammen jedoch aus einer mRNA-Vorläufer und zwar durch Spleissen mittels Wechselwirkung zwischen den *cis*-agierenden Elementen (Spleiss-*Enhancer*) und den *trans*-agierenden Faktoren (wie snRNP's und SR-Proteine) sowie den antagonistischen Spleissfaktoren (wie hnRNP's). Spleissvarianten besitzen eine grosse Bedeutung bei der Regulation der Genexpression. Sie sind nicht nur in den Zellen und Geweben variabel verteilt (Kraaij et al., 1998; Kone and Higham, 1998), sondern kommen auch manchmal nur in bestimmten Entwicklungsphasen vor (Wada et al., 1998; Kawahara et al., 2000). Manche Spleissvarianten unterscheiden sich in der 5'-UTR, deren *cis*-agierende Struktur-Elemente die Translationseffizienz durch die Wechselwirkung mit verschiedenen Faktoren entweder positiv oder negativ beeinflussen (Mariottini et al., 1999; Brewer et al., 1999; Thiele et al., 1999; Djali et al., 1998). Andere variieren durch stromaufwärts liegende offene Leserahmen (uORFs), die sowohl die Translationseffizienz als auch die mRNA-Stabilität negativ beeinflussen können (Ban et al., 1998; Mariottini et al., 1999) (siehe Punkt 1.2.1-1.3.3).

Manche Spleissvarianten haben verschiedene 3'-UTR, deren Strukturelemente häufig unterschiedliche Wirkung auf die mRNA-Stabilität ausüben (Wilson et al., 1999; Wardrop and Richardson, 1999).

Nicht selten kodieren die Spleissvarianten verschiedene Isoformen eines Proteins, z.B. die "*truncated*" Formen, die entweder funktionell ähnlich (Snyder et al., 1999) oder unterschiedlich sein können (Kotera et al., 1999; Kraaij et al., 1998; Nikolic et al., 1998; Kone and Higham, 1998). Zudem kann eine unterschiedliche Adressierung erfolgen (Prinz et al., 1998; Norvell et al., 1999).

1.4. Zielsetzung und Problemstellung

Tumorzellen benötigen für die Metastasierung und Invasion die Proteasen, die die basale Membran und extrazelluläre Matrix effektiv abbauen können. Für diese Aufgabe kommen sowohl lysosomale Proteasen als auch Matrix-Metallo-Proteasen (MMPs) und Urokinase in Frage. Über Cathepsin B, L und D als prognostische Tumormarker ist häufig berichtet worden. Die Regulation der Expression dieser Proteasenfamilie ist ein wichtiger Mechanismus, der den Prozess der Metastasierung und Gewebe-Invasion entscheidend reguliert.

Das Mißverhältnis zwischen einer mRNA und ihrem Translationsprodukt in einer Tumorzelle gegenüber normalen Zellen kann das Ergebnis einer spezifischen Translationsregulation sein. Wie aus der hier dargelegten kurzen Zusammenfassung entnommen werden kann, sind die Mechanismen der posttranskriptionellen Kontrolle ein Objekt zahlreicher Untersuchungen während der letzten Jahre geworden. Aufgrund der vielfältigen wirksamen Mechanismen ist jedoch erforderlich, den spezifischen Regulationstyp einzelner Gene aufzuklären. Durch die posttranskriptionelle Regulation können nicht nur verschiedene mRNA's mit verschiedener Rate translatiert werden. Die Verhältnisse zwischen mRNA und entsprechendem Protein können zudem in verschiedenen Zuständen und Entwicklungsphasen der Zelle und Gewebe voneinander vollkommen unterschiedlich vorkommen. Dies muss im übrigen auch bei der Analyse von Expressionsmustern mittels cDNA-Arrays berücksichtigt werden.

In den meisten malignen Tumoren ist eine erhöhte mRNA-Expression des hCATL im Vergleich zu den entsprechenden normalen Geweben nachgewiesen worden (Chauhan et al., 1991). Über eine entsprechend erhöhte Aktivität des hCATL ist bei Brustkrebs, malignem Gliom, Osteosarkom, Prostatatumor, Kolonkarzinom, gastrischem Adenokarzinom, Leber- und Lungenkarzinom berichtet worden (Thomssen et al., 1995; Sivaparvathi et al., 1996; Park et al., 1996; Friedrich et al., 1999; Herszenyi et al., 1999; Harbeck et al., 2000; Russo et al., 2000; Foekens et al. 1998, Hantschmann et al., 1998; Thomssen et al. 1998; Lah et al. 2000). Ferner wurde eine erhöhte Sekretion des Procathepsin L induziert, indem NIH3T3-Fibroblasten durch Kirsten-Virus transformiert wurden (Gal et al., 1985).

Im Gegensatz zu diesen Befunden ist ein signifikant erniedrigter hCATL-Spiegel in malignen Karzinomen von Niere und Lunge gegenüber gesundem Organgewebe gemessen worden (Kirschke et al., 1997). Diese Diskrepanz ist bisher noch nicht aufgeklärt worden. Bisherige Kenntnisse wiesen darauf hin, daß das Gen des hCATL als einzelne Kopie im Genom vorhanden und auf Position q21-22 des Chromosom 9 lokalisiert ist. Der kodierende ORF des hCATL-Gens besteht aus 8 Exons und 7 Introns (Chauhan et al., 1993).

Zwei verschiedene hCATL-mRNA's, die als hCATL-A und -B bezeichnet wurden, unterscheiden sich nur in der 5'-UTR (Troen et al., 1988; Joseph et al., 1988). Während die 5'-UTR von hCATL-A mRNA dem Exon 1 (278 nt) entspricht, stammt die 5'-UTR von hCATL-B mRNA nicht aus Exon 1, sondern nur aus einem Teil des Intron 1 (188 nt). Zwei weitere mRNA-Spezies des hCATL-A wurden durch RT-PCR nachgewiesen, die als alternative Spleissvarianten hCATL-A1 und -A2 bezeichnet wurden (Rescheleit et al., 1996). Diese Spezies unterscheiden sich am 3'-Ende des Exon 1. Im Vergleich zur hCATL-A mRNA ist das Exon 1 für die beiden mRNA's von 278 nt auf jeweils 253 und 188 nt verkürzt.

In der vorliegenden Arbeit soll der Schwerpunkt auf die 5'-UTR des hCATL gelegt werden, die normalerweise eine grosse Bedeutung für die Translatierbarkeit der mRNA hat. Bisher gibt es noch keine Untersuchungen über die Funktion und über die Verteilung der hCATL-Spleissvarianten in verschiedenen Geweben. Aus diesem Grund und zur Erklärung des eigentümlichen Befund eines erniedrigten Cat. L-Spiegels in Nierentumoren bei erhöhter mRNA-Konzentration sollen in dieser Arbeit folgende Punkte untersucht werden:

- *ob die bisher beschriebenen Spleissvarianten der hCATL-mRNA in Geweben in vivo tatsächlich nachgewiesen werden können,*

-
- *ob die hCATL-Spleissvarianten unterschiedlich stabil sind,*
 - *wie die Verhältnis der hCATL-Spleissvarianten in Tumor- und Normalgewebe ist,*
 - *ob die hCATL-Spleissvarianten unterschiedliche Translationsrate bzw. Translationseffizienz aufweisen.*

2. Material

2.1. Biologisches Material

2.1.1. Bakterienstämme

Die *E.coli* Stämme TOP 10 und TOP10F wurden von Invitrogen bezogen und für die Klonierung verwendet.

2.1.2. Tierische Zellen

Die HEK293-Zellen (etablierte humane embryonale Nieren-Zelllinie) und NIH3T3-Zellen (Maus Fibroblasten) wurden mir im Institut für Biochemie 1, Jena zur Verfügung gestellt. Die A498-Zellen (etablierte humane Nierentumor Zelllinie) und BHK21-Zellen (etablierte Babyhamster Nieren-Zelllinie) wurden von DSMZ (Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH) bezogen.

2.1.3. Humane Gewebe und Blutzellen

Verschiedene humane Gewebe bzw. Biopsien wurden aus folgenden Kliniken der FSU Jena erhalten: normales Nierengewebe, peripheres und zentrales Nierentumorgewebe von Oberarzt Dr. Schlichter, Poliklinik für Urologie; normales Brustgewebe und Brusttumorgewebe sowie Plazenta von Prof. Dürst, Frauenklinik; entzündliches Hautgewebe von Prof. Wollina, Hautklinik; Magen- und Duodenum-Biopsien von Prof. Bossekert, Klinik für Innere Medizin I; heparinisiertes Blut von Frau Oberärztin Dr. Horn in der Abteilung für Bluttransfusion. Die Gewebe wurden histologisch klassifiziert und in flüssigem Stickstoff eingefroren, anschließend bei -80°C gelagert.

2.1.4. Enzyme, Kits und Transfektionsmittel

M-MLV-Reverse-Transkriptase, Taq-DNA-Polymerase, T4-Polynukleotid-Kinase, T4-DNA-Ligase, Terminal-nukleotidyl-Transferase sowie Restriktionsendonukleasen wurden von Gibco BRL bezogen. Pfu-DNA-Polymerase stammte von Stratagene. SequiTherm™ Long-Read™ Cycle Sequenzierungs-Kit wurde von Epicentre Technologies bezogen. Ribo-Quant *in vitro* Transcription Kit und RNase Protection Assay Kit stammten von Pharmingen. TNT® Coupled Rabbit Reticulocyte Lysate wurde von Promega bezogen.

TOPO-TA-Cloning Kit stammte von Invitrogen. QIAprep Spin Miniprep Kit (250), Qiagen Plasmid Maxi Kit und QIAEXII Gel Extraction Kit sowie Transfektionsmittel SuperFect wurden von Qiagen bezogen. Transfektionsmittel DOTAP und Fugiene-6 stammten von Roche.

2.1.5. Nukleinsäuren

Oligonukleotide wurden sowohl von Herrn Dr. Birch-Hirschfeld, Institut für Virologie der FSU Jena als auch von der Firma Jena-Bioscience erworben. Die Fluoreszenz-markierten Oligonukleotide für Sequenzierungen wurden von MWG-Biotech bezogen.

Der pCR 2.1 TOPO-Vektor und der eukaryotische Expressionsvektor pcDNA3.1 stammten von Invitrogen. Die Expressionsvektoren pEGFP-N3 und pd2EGFP-N1 für das Reportergen GFP (*green fluorescent protein*) wurden von Clontech bezogen.

2.2. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Sämtliche verwendeten Chemikalien wurden in p.a. Form bzw. dem höchsten erhältlichen Reinheitsgrad eingesetzt. Neben den Standardchemikalien wurden nach Bezugsquellen geordnet, verwendet :

Aldrich Chemicals (Sigma): 5,6- chloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole (DRB); Actinomycin D. Hartmann Analytics, Mannheim: [alpha- ³²P] dCTP 3000Ci/mmol; [alpha- ³²P] UTP 3000Ci/mmol; [gamma- ³²P] ATP 3000Ci/mmol; [alpha- ³⁵S] Methionin 3000Ci/mmol.

2.3. Geräte

Neben Standardlaborgeräten wurden verwendet: LS-50B Luminescence-Spektrometer (Perkin Elmer); Thermocycler PTC-100 (MJ Research Inc.); LI-COR 4000L Sequencer (MWG-Biotech); Ultraschall-Desintegrator, Bandelin-Sonoplus HD70 (Bandelin Electronic); Ausschwingzentrifuge Hettich Rotanta TR (Hettich, Tuttlingen).

3. Methoden

3.1. Arbeiten mit tierischen kulturierten Zellen

3.1.1. Zellkultur

Die HEK293 (transformierte humane embryonale Nierenzelllinie) bzw. die A498 (etabliertes humanes Nierenzellkarzinom) -Zellen wurden in 25 cm² Zellkulturflaschen im Brutschrank bei 37°C und 7.5 % igem CO₂ gezüchtet. Als Medium diente DMEM (*Dulbecco's modified Eagles' Medium*), dem 10 % hitzeinaktiviertes FKS (fötales Kälbeserum) und 50µg/ml Gentamycin zugesetzt wurde. Das rasche Wachstum erforderte eine Umsetzung der Zellen aller 3-5 Tage. Dabei wurden die Zellen mit Trypsin abgelöst und in einer Verdünnung von 1:3 bis 1:6 neu ausgesät.

Die BHK21-Zellen wurden ebenfalls unter fast gleichen Bedingungen wie die HEK293-Zellen gezüchtet. Als Medium diente MEM (*Minimal Essential Medium* mit Earle's Salzen und L-Glutamin), mit dem die Zellen im Brutschrank bei 5 % igem CO₂ gezüchtet werden sollen. Andere Tumorzelllinien wie z.B. die 97TM1, 103H, HP29, HepG2, MDA-MB3, HeLa, usw., die zum Zweck der RNA-Gewinnung verwendet wurden, wurden mir von anderen Kollegen überlassen. Diese Zellen wurden ebenfalls mit DMEM bzw. MEM kultiviert.

3.1.2. Einfrieren und Auftauen der Zellen

Zum Einfrieren wurden die Zellen aus einer 25 cm² Kulturflasche mit Trypsin abgelöst, mit 5 ml Kulturmedium verdünnt, 5 min bei 800 g in einer Ausschwingzentrifuge (Hettich Universal 30RF) gesammelt und in 2 ml FKS/10% DMSO (Dimethylsulfoxid) resuspendiert. Die Aliquots wurden dann langsam bei -80°C eingefroren und ungefähr 24 h später in flüssigen Stickstoff zur endgültigen Lagerung transferiert. Die Zellen wurden bei Raumtemperatur aufgetaut. Das für die Zellen toxische DMSO wurde durch rasches Verdünnen mit Kulturmedium und anschliessender Zentrifugation bei 800 g entfernt. Je nach Dauer der Lagerung überlebten 50-80 % der Zellen, die in DMEM bzw. MEM mit 10% FKS schnell ihre normale Wachstumsgeschwindigkeit erreichten.

3.2. Arbeiten mit *E. coli*

3.2.1. Züchten von Bakterien in Flüssigkultur

Zur Aufzucht der *Escherichia coli* Stämme TOP10F wurde steriles LB-Medium (Luria-Broth) verwendet. Wenn die Bakterien mit dem pCR2.1 TOPO-Vektor oder mit den pcDNA3.1(+) abgeleiteten Vektoren transformiert waren, wurde dem Medium zusätzlich 50 mg/l Ampicillin zugegeben. Mit dem pd2EGFP-N1 Vektor transformierte Bakterien wurden in LB-Medium mit 50 mg/l Kanamycin gezüchtet. Alle Flüssigkulturen wurden bei 37°C im Bakterienschüttler gehalten.

3.2.2. Züchten von Bakterien auf Agarplatten

Das LB-Medium mit 15 g/l Agar wurde autoklaviert, auf 50°C abgekühlt, entsprechende Antibiotika zugesetzt, in Petrischalen gegossen und unter sterilen Bedingungen abgekühlt. Die Platten wurden mit Transformationsansatz angeimpft und verkehrt herum im Bakterienbrutschrank bei 37°C inkubiert.

3.2.3. Transformation von kompetenten *E. coli* Stämmen (Ausubel et al., 1994)

Aliquots von 50 µl transformationskompetente *E. coli* Stämme TOP10F wurden auf Eis aufgetaut und mit 2 µl Mercaptoethanol vermischt. Nach 5 Minuten wurde 1-2 µl Ligationsansätze zugesetzt und 15 min bei 0°C weiter inkubiert. Nach dem Hitzeschock von 1 min bei 42°C wurden die Bakterien mit 250 µl SOC-Medium (2% Tryptone, 0.5% Hefe-extrakt, 10 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 10 mM MgCl, 10 mM MgSO₄, 20 mM Glucose) versetzt und für 30 min bei 37°C im Brutschrank geschüttelt. Diese Vorkultur wurde dann auf den vorgewärmten LB-Agarplatten mit dem entsprechenden Antibiotikum (Kanamycin bzw. Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die positiven Klone wurden auf entsprechende Antibiotikaresistenz selektioniert und amplifiziert.

3.3. Isolierung der RNA und DNA

3.3.1. Isolierung der Gesamt-RNA aus humanem Gewebsmaterial

Das Gewebe (50-200 mg) wurde erst vom minus 80°C Tiefkühlschrank zum flüssigen Stickstoff verlegt. Zellaufschluss des Gewebes erfolgte mit Hilfe eines Mörsers unter ständiger Abkühlung mit Stickstoff. Das pulverisierte Gewebe wurde mit Trizol-Reagenz (Gibco BRL) in Glassröhrchen aufgenommen und mit einem Gewebehomogenisator jeweils 20-30 Sekunden homogenisiert. Das Homogenat wurde in ein 2 ml-Eppendorf-Röhrchen transferiert und weiter nach Angaben des Herstellers aufgearbeitet. Die RNA-Lösung wurde anschliessend in 75 % Ethanol und 0.3 M Natriumacetat, pH 5 gelagert. Das entspricht einem Gemisch von 50 µl Gesamt-RNA Lösung in Wasser mit 250 µl 100 % Ethanol und 33 µl 3 M Natriumacetat. Zur Konzentrationsbestimmung wurde 5 µl Aliquot der obengenannten RNA-Lagerlösung mit DEPC-Wasser (DEPC: Diethylpyrocarbonat) 1:20 verdünnt und die Lichtabsorbanz bei 260 nm am Photometer gemessen.

3.3.2. Isolierung der Gesamt-RNA aus Blutzellen

Um die RNA aus allen Blutzellen zu isolieren, wurde 20 ml heparinisiertes frisches Blut mit dreifachem Volumen Erythrozyten-Lysispuffer (1 mM Ammonium Hydrocarbonat und 150 mM Ammonium Chlorid) versetzt. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 800 g und 20°C wurde der Überstand verworfen und das Zellpellet (Leukozyten) zweimal mit 10 ml gleichem Lysispuffer gewaschen. Anschliessend wurde das Leukozytenpellet mit Trizol-Reagenz für die Extrahierung von Gesamt-Blut RNA aufgearbeitet wie im Punkt 3.3.1 beschrieben.

Um die RNA für Lymphozyten und Makrophagen getrennt zu isolieren, wurden 30 ml heparinisiertes Blut mit gleichem Volumen Serum-freiem RPMI-Medium versetzt. 3 ml Lymphoprep (Nycomid Pharma AS, Oslo) wurde in 15 ml-Röhrchen (Greiner) vorgelegt und 5 ml des Blut-Medium-Gemisches tropfenweise an der Wand herunterlaufend zugegeben. Nach einer Zentrifugation von 15 min bei 800 g und Raumtemperatur wurde die obere Phase verworfen und die mittlere Phase (Lymphozyten) in zwei neuen Röhrchen gesammelt. Die Zellen wurden für 10 min bei 800 g abzentrifugiert und zweimal mit Serum-freiem Medium gewaschen. Das Zellpellet wurde in Medium mit 10 % FKS resuspendiert, jeweils 2×10^6 Zellen in einer 60 cm² Kulturflaschen ausgesät und im CO₂-Brutschrank kultiviert. Nach 3-4 Stunden wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen im Medium (hauptsächlich B- und T-Zellen) durch Zentrifugation gefällt und für die RNA-Extraktion geerntet. Die an der Petrischale angehafteten

Zellen (B-Zellen und Makrophagen) wurden zweimal mit PBS (*phosphate buffered saline*) gewaschen und für die RNA-Extrahierung in der Flasche geerntet.

3.3.3. Isolierung von Gesamt-RNA aus adherenten Kulturzellen

Für RNA-Isolierung wurden die Zellen bei ungefähr 90% Konfluenz geerntet. Das Medium wurde abgesaugt und die Zellschicht wurde einmal mit gleichem Volumen gewaschen. Zum Zellaufschluss wurde 1 ml Trizol-Reagenz per 25 cm²-Fläche zugegeben. Die nachfolgenden Schritte waren gleich denen der Gesamt-RNA-Präparation aus dem Gewebe (siehe Punkt 3.3.1.)

3.3.4. Isolierung der Plasmid DNA aus transformierten *E.coli*

Für die Isolierung kleinerer Plasmid-DNA Mengen für Klonierungsexperimente und Restriktionsanalysen wurden verschiedene "Miniprep Kit"s von Qiagen bzw. Macherey-Nagel verwendet. Die Bakterien wurden durch alkalische Lyse (Birnboim und Doly, 1979) aufgeschlossen und die Plasmid-DNA über die Bindung an Säulen-Material gereinigt. Dabei wurde die Vorschrift des Herstellers befolgt. Die gereinigte Plasmid-DNA wurde meistens nicht mit Puffer sondern direkt mit Wasser eluiert, wenn die Plasmidlösung in grossen Volumen für einen Restriktionsverdau eingesetzt werden musste.

Für die Gewinnung von Endotoxin-freien und grösseren Plasmid-DNA Mengen für die Expression in Säugetierzellen wurde ein "*EndoFree™ Plasmid Maxi Kit*" (Qiagen) verwendet.

3.3.5. Reinigung der DNA aus Agarosegelen

DNA-Fragmente, die für Klonierungszwecke verwendet wurden, wurden aus den Agarosegelen mit Hilfe des "QIAEX II" (Qiagen) isoliert, oder über Glasswolle gereinigt. Beim "QIAEX II" Kit war die Ausbeute meistens so gering, dass die DNA-Menge manchmal nicht ausreichte. Bei der Reinigung durch Glasswolle wurde ein 2 ml-Röhrchen (Eppendorf) am Boden durchstochen und die Hälfte des Röhrchens mit Glasswolle gefüllt. Das Röhrchen wurde auf ein anderes intaktes Röhrchen gesteckt, so dass es wie ein "Spinsäule" aussah. Das aus dem Agarosegel geschnittenen DNA-Fragment wurde auf die Glaswolle gelegt und 1 min bei 12,000 g abzentrifugiert. Die abzentrifugierte Flüssigkeit aus dem Agarosegel wurde mit zweifachem Volumen eiskaltem Ethanol und 1/10 Volumen 3 M Natriumacetat versetzt und 15 min bei 20,000 g und 4°C abzentrifugiert. Nach dem Waschen mit 75 % Ethanol wurde das Pellet mit destilliertem Wasser aufgelöst. Durch diese Methode konnte gewonnene 10-20 mal mehr DNA gewonnen werden als durch kommerziell erhältliche Kits.

3.3.6. Photometrische Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration reiner RNA und DNA (ohne Verunreinigung mit Protein oder andere Nukleinsäuren) wurde im Photometer (Pharmacia Biotech) bestimmt. Dabei wurde die Bedienungsanleitung des Geräts gefolgt.

3.4. Analyse der Gesamt-RNA durch Polymerase-Kettenreaktionen (PCR)

3.4.1. Synthese der cDNA

2 µg Gesamt-RNA wurde in einem 10 µl Ansatz zu cDNA revers transkribiert. Für die eingesetzten Mengen der benötigten Reagenzien wie Oligo (dT)₁₈, Dithiothreitol, RNase-Inhibitor und M-MLV Reverse-Transkriptase (Gibco BRL) wurden entweder Standard Protokolle verwendet (Ausubel et al., 1994) oder der Vorschrift des Herstellers (Gibco BRL) gefolgt.

3.4.2. Standard PCR

Die Amplifizierung der cDNA mit Taq-DNA-Polymerase erfolgte im Wesentlichen nach Standard Protokollen (Ausubel et al., 1994), und die Modifizierungen dazu wurden in den einzelnen Beschreibungen angegeben. Um die Genauigkeit der PCR bei der Klonierung zu erhöhen, wurde die Pfu-DNA-Polymerase benutzt. Die optimale Annealingtemperatur wurde mit einem Computerprogramm (Boehringer Mannheim) berechnet.

3.4.3. RT-PCR zur Gewebeverteilung der hCATL-Transkripte

Hier dienten die cDNAs aus verschiedenen humanen Geweben und Zellen als Template. Um die Gewebeverteilung von 5'-UTR-Spleissvarianten zu untersuchen, wurde ein sense Primer am 5'-Ende des Exon I, nämlich ab der Nukleotidstelle 13 in Exon 1, und ein antisense Primer aus dem Exon IV des hCATL verwendet. Die Sequenz und Lage des sense bzw. antisense Primers werden in Abb. 4A (Ergebnisse) gezeigt. Sonstige Parameter waren wie in der folgenden Tabelle dargestellt.

PCR- Ansatz:

eingesetzte cDNA Menge	1-2 µl
Parameter des PCR Programs	Denaturierung: 94°C, 20 sec; Annealing: 58°C, 20 sec; Polymerisierung: 72°C, 30 sec; Zahl der Zyklen: 28
Enzym	Taq-DNA-Polymerase

3.4.4. RACE-PCR

Da die bisher beschriebenen Transkripte der hCATL-mRNA noch nicht mit den Methoden untersucht wurden, mit denen das 5'-Ende bzw. das 3'-Ende der mRNA nachgewiesen wird, wurde hier mit 5'- bzw. 3'-RACE-PCR (RACE: *rapid amplification of cDNA ends*) versucht, die beiden Enden der mRNA zu überprüfen.

3.4.4.1. 5'-RACE-PCR

Für diesen Ansatz wurden drei genspezifische antisense Primer (sp1-3, siehe unten) ausgewählt, welche jeweils an den verschiedenen Stellen des Exon 2 vom hCATL-Gen beginnen (siehe auch Abb. 2A, Ergebnisse). Dabei wurde ein 5'-RACE-System (Gibco BRL) verwendet und ausschliesslich den von den Herstellern empfohlenen Vorschriften gefolgt. Die Besonderheit des Systems ist, dass das 5'-Ende der cDNA nach der "Tailing"-Reaktion in Gegenwart von *Terminal-deoxynucleotidyl-Transferase* einen poly(C)-Schwanz bekommt, der eine PCR-Amplifizierung mit den sogenannten „*Abridged Universal Amplification Primer*“ (AUAP) und

„*Universal Amplification Primer*“ (UAP) bei höherer *Annealing*-Temperatur in den nachfolgenden Schritte ermöglicht. Gesamt-RNA diente aus einem Nierentumorgewebe als Template. Die Sequenz und Lage der Gen-spezifischen Primern werden in Abb. 2A (Ergebnisse) gezeigt.

Abridged Universal Amplification Primer 5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG
(AUAP) GGI IGG GII GGG IIG- 3'

Universal Amplification Primer (UAP) 5'- GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC- 3'

3.4.4.2. 3'-RACE-PCR

Um eine Variation am 3' Ende der hCATL-mRNA zu detektieren, wurde eine 3'-RACE-PCR durchgeführt. Dazu wurde zwei Gen-spezifische Primer (gsp1-2, siehe unten) entworfen. Diese lagen jeweils in der sense Richtung im Exon 4 bzw. Exon 5 vom hCATL-Gen (siehe auch Abb. 3A, Ergebnisse). Dazu wurde ein „*Oligo (dT)- Anchor Primer*“ (siehe unten) in der cDNA Synthese eingesetzt. Die cDNA konnte dann mit einem „*PCR Anchor Primer*“ (siehe unten) in der nachfolgenden PCR mit gsp1 und der *nested- PCR* mit gsp2 amplifiziert werden. Gesamt-RNA aus einem Nierentumorgewebe diente als Template. Die Sequenz und Lage der Gen-spezifischen Primern wurden in Abb. 3A (Ergebnisse) gezeigt.

Oligo (dT)-Anchor-Primer 5'GACCACGCGTATCGATGTCGACTTTT
TTTTTTTTTTTTTV-3'

PCR-Anchor-Primer 5'-GACCACGCGTATCGATGTCGAC-3'

3.4.5. PCR-gekoppelte Sequenzierung

Die Sequenzierung der Plasmid-DNA erfolgte nach dem Kettenabbruchverfahren mit Dideoxynukleotiden (Sanger et. al., 1977) und einem Zyklus-Sequenzierungsprotokoll für PCR. Dabei wurden die Fluoreszenz-markierten Sequenzierungsprimer von MWG-Biotech und die SequiTherm EXEL™ II DNA Sequencing Kit-LC von Epicentre Technologies eingesetzt und den von dem Hersteller empfohlenen Vorschriften gefolgt.

3.5. Klonierung von vollständigen hCATL-cDNAs

Um die vollständige Sequenz der hCATL-Transkripte zu analysieren und die cDNAs anschliessend in Kulturzellen zu exprimieren, wurden die hCATL-mRNA als PCR-Produkt einkloniert und anschliessend in die entsprechende Expressionsvektoren bzw. Reportergenvektoren umklontiert.

Um die sämtlichen Transkripte der hCATL-mRNA zu klonieren, wurde nach den Sequenzdaten des hCATL-Gens aus der Genbank (Chauhan et al., 1991) ein Primerpaar ausgewählt. Dabei lag der sense Primer am 5'-Ende des Exon 1 und antisense Primer am 3'-Ende des Exon 8. Sonstige Parameter waren wie in der folgenden Tabelle dargestellt.

PCR- Ansatz:

eingesetzte cDNA	1 µl
sense Oligonukleotid	5'-AGAACCGCGACCTCCGCAAC-3'
antisense Oligonukleotid	5'-CATT TTTATTTAAACAGGTAAAAATTTATACATCC-3'
Parameter des PCR-Programs	Denaturierung: 94°C, 20 sec; Annealing: 58°C, 20 sec; Polymerisierung: 72°C, 3 min; Zahl der Zyklen: 28
Enzym	Taq- und Pfu-DNA-Polymerase in einem Verhältnis von 1:5

Mit diesem Primerpaar wurde zunächst eine cDNA aus malignen Nierentumorgewebe durch PCR in Gegenwart von Pfu-DNA-Polymerase (Stratagene) amplifiziert. Dann wurde das PCR-Produkt in den pCR 2.1-TOPO-Vektor (Invitrogen) ligiert. Diese Ligation erforderte einige überhängende Adeninreste am 3'-Ende des PCR-Produkts. Deshalb wurde das PCR-Produkt extra 10 min bei 72°C mit Taq-DNA-Polymerase und dATP behandelt. Die Ligation in pCR2.1-TOPO-Vektor (Invitrogen) und die Transformation in *E. coli*-Zellen, TOP10F (Invitrogen), sowie Isolierung des Plasmids mit "Minipräp Kit" (Macherey-Nagel) und anschließende Sequenzierung der Plasmide nach einem Zyklus-Sequenzierungsprotokoll (Epicentre Technologies) wurden nach den empfohlenen Methoden des Herstellers durchgeführt.

3.6. Erzeugung von Genkonstrukte

3.6.1. Erzeugung der pcDNA3.1(+) Konstrukte mit den hCATL-cDNAs

Die cDNA-Enden der hCATL-Transkripte besitzen nicht die gleichen Schnittstellen für die Restriktionsendonukleasen wie bei der multiplen Klonierungsstelle des Expressionsvektors pcDNA3.1(+). Deshalb wurden die BamH I bzw. die Not I Schnittstellen in einem sense Primer bzw. einem antisense Primer eingebaut und durch PCR an den entsprechenden Enden der hCATL-cDNA eingeführt. Da die untersuchten hCATL-cDNAs am 5'- bzw. 3'-Ende identisch waren, konnten sie nur mit einem einzigen Primerpaar amplifiziert werden. Die PCR-Fragmente wurden in den pCR 2.1-TOPO-Vektor einkloniert und sequenziert.

PCR- Ansatz:

DNA-Matrize	25-50 ng pCR 2.1 Plasmidkonstrukt mit einer hCATL-cDNA
sense Oligonukleotid	5'-GCTC <u>GATCC</u> GCAACCTTGAGCGGCATCC-3' (<u>Bam HI Schnittstelle</u>)
antisense Oligonukleotid	5'-GCGG <u>CCGCGG</u> TAAAAATTTATACATC-3' (<u>Not I Schnittstelle</u>)
Parameter des PCR Programs	Denaturierung: 94°C, 20 sec; Annealing: 58°C, 20 sec; Polymerisierung: 72°C, 3 min; Zahl der Zyklen: 28

Enzym	Taq- und Pfu-DNA-Polymerase in einem Verhältnis von 1:5
Grösse der PCR Produkte	Ungefähr 1,60 kb, 1,50 kb und 1,45 kb

Das neu erzeugte pCR2.1-Plasmidkonstrukt wurde mit den Enzymen BamH I und Not I (Gibco BRL) verdaut, um die hCATL-cDNA Fragmente mit eingebauten Schnittstellen zusammen herauszuschneiden. Mit denselben Restriktionsenzymen wurde der pcDNA3.1(+) Vektor verdaut, um die multiplen Klonierungsstellen zu öffnen. Nach dem Verdau wurde das cDNA-Fragment bzw. der geöffnete Vektor aus dem Agarosegel gereinigt (siehe Punkt 3.3.5.).

Anschliessend wurde 10-30 fmol cDNA mit 30-90 fmol linearisiertem Vektor in Gegenwart von T4-DNA-Ligase (Gibco BRL) bei 23 °C für 1 Stunde ligiert. Dabei werden die cDNA's zwischen dem CMV-Promotor und der BGH-poly(A)-Signal des Vektors eingefügt. Nach der Transformation in kompetente *E. coli*-Zellen (siehe Punkt 3.2.3.), Miniaufschlusskontrolle (siehe Punkt 3.3.4) und Sequenzierung wurden die Plasmide in ausreichend grossen Mengen präpariert (siehe Punkt 3.3.4.).

3.6.2. Erzeugung der pd2EGFP-N1 Konstrukten mit den 5'-UTRs der hCATL

Das Reporterplasmid pd2EGFP-N1 beruht auf einen modifizierten pcDNA3.1(+)-Grundgrüst, bei dem die Expression des destabilisierten EGFP's (d2EGFP) unter Kontrolle des CMV-Promotors steht. Die d2EGFP cDNA enthält keine funktionelle 5'-UTR sondern nur eine inserierte „Kozak-Sequenz“ (~10 nt) um den AUG-Startcodon des d2EGFP. In diesen Vektor wurden verschiedene 5'-UTRs bzw. verschiedene Teile einer 5'-UTR vor den Leserahmen des Reportergens d2EGFP eingefügt. (siehe Abb.13, Ergebnisse). Die Nhe I und BamH I Schnittstellen der multiplen Klonierungsstelle des Plasmids wurden für die Umklonierung gewählt, und nach gleichem Prinzip wie bei der „Erzeugung der pcDNA3.1(+)-Konstrukten“ (siehe Punkt 3.6.1.) die beiden Schnittstellen durch PCR-Primer in die zu klonierenden cDNA-Fragmente eingebaut.

Die Vorbereitung der linearisierten Vektoren und cDNAs mit eingebauten Schnittstellen, Ligation, Transformation und Präparation des Plasmids sind nach dem gleichen Protokoll bearbeitet worden, wie bei der „Erzeugung der pcDNA3.1(+) Konstrukten“ (siehe Punkt 3.6.1.).

PCR- Ansatz:

Template DNA	25-50 ng pCR 2.1 Plasmidkonstrukt mit einer hCATL-cDNA
sense Oligonukleotid	5'- <u>GCTAGCTCCGCAACCTTGAGCG</u> -3' (<u>Nhe I Schnittstelle</u>)
antisense Oligonukleotide:	Für hCATL-A cDNA
	5'- <u>GGATCCGTTTTTAAACCTGTGTCCACCCGG</u> -3' (<u>Bam HI Schnittstelle</u>)
	Für hCATL-A2 cDNA
	5'- <u>GGATCCGTTTTTAAACCTCAAGGCCAGCAG</u> -3' (<u>Bam HI Schnittstelle</u>)
	Für hCATL-A3 cDNA
	5'- <u>GGATCCGTTTTTAAACTCGACCGC</u> -3' (<u>Bam HI Schnittstelle</u>)

Parameter des PCR Denaturierung: 94°C, 20 sec; Annealing: 58°C, 20 sec;
 Programs Polymerisierung: 72°C, 45 sec; Zahl der Zyklen: 28
 Enzym Taq- und Pfu-DNA-Polymerase in einem Verhältnis von 1:5
 Geschätzte Grösse ungefähr 290 bp, 200 bp und 140 bp
 der PCR-Produkte

3.6.3. Erzeugung von pCR2.1-Konstrukten für *in vitro* Transkription

In vitro Transkription mit T3-, T7- oder SP6-RNA-Polymerase ist eine konventionelle Methode für die Herstellung von antisense RNA-Sonden. Dafür muss die DNA-Matrize mit den entsprechenden Sequenzen des T3-, T7- oder SP6-Promotors fusioniert werden. In diesem Versuch wurde der T7-Promotor verwendet und durch zwei verschiedene Methoden mit dem Exon 1 von hCATL, dessen Sequenz der gesamten 5'-UTR von hCATL-A mRNA entspricht, verbunden.

Die erste und einfachste Möglichkeit ist der Einbau der T7-Promotorsequenz in einen genspezifischen antisense Primer und die Amplifizierung des DNA-Matrize durch PCR. Für die beschriebene Untersuchung lag der sense Primer am 5'-Ende des Exon 1 des hCATL und der antisense Primer enthielt die Sequenz am 3'-Ende des Exon 1 und die T7-Promotorsequenz. Das PCR-Produkt konnte direkt zur *in vitro* Transkription eingesetzt werden. Die Sequenzen der eingesetzten Primer waren:

sense Oligo Nukleotid	5'-AGAACCGCGACCTCCGCAAC-3' ab Stelle 1 im Exon 1
Antisense Oligo-Nukleotid	5'-TAATACGACTCACTATAGGAGCCG- GGTGGACACAG-3' (T7-Promotor) ab Stelle 278 im Exon 1 in der antisense Richtung

Die zweite Möglichkeit ist die Klonierung des DNA-Fragments in einen Vektor, der den T7 Promotor bereits enthält. Dazu wurde das Exon 1 mit einem Primerpaar durch PCR amplifiziert. Es wurden gleichen Primer wie für die vorherige PCR eingesetzt, aber der antisense Primer enthielt keine eingebaute T7-Promotorsequenz. Das PCR-Produkt wurde in pCR2.1-TOPO-Vektor (Invitrogen) einkloniert (siehe auch Punkt 3.5.). Durch Sequenzierung wurde das Plasmid selektiert, in dem der T7-Promotor in der antisense Richtung gegenüber der cDNA sitzt. Das Plasmid wurde mit BamHI geschnitten, damit die RNA-Synthese an dieser Stelle aufhört. Nach der Linearisierung wurde das Plasmid gereinigt (siehe Punkt 3.3.5) und für die Synthese der antisense RNA-Sonde durch die *in vitro* Transkription eingesetzt (siehe Punkt 3.10). Diese zweite Methode wird dann benutzt, um ein Fragment zu selektieren, dessen Sequenz vorher durch Sequenzierung überprüft und bestätigt werden muss.

3.7. Elektrophoretische Auftrennung von DNA und RNA

3.7.1. Standard Agarosegel

PCR-Produkte und Plasmide nach dem Restriktionsenzymverdau wurden nach standard Methoden (Ausubel et al., 1994) auf Agarosegelen getrennt. Um die PCR-Fragmente voneinander zu trennen, deren Grösse kleiner als 400 Nukleotide und deren Unterschiede weniger als 30 Nukleotide waren, wurde ein 3-3,5 % Agarose-Gemisch verwendet. Dazu wurden ein Viertelgewicht Agarose mit niedriger Schmelztemperatur und drei Viertelgewicht Agarose mit normaler Schmelztemperatur vermischt, gekocht und relativ warm gegossen.

3.7.2. Denaturierendes Formaldehyd-Agarosegel

RNA wurde in denaturierenden Agarosegelen aufgetrennt. Dazu wurden 3 µg Agarosegel mit 217 ml RNase freiem Wasser und 25 ml 10x MOPS/EDTA Puffer [0.2 M 3-(N-Morpholino) Propionsäure), 50 mM Natriumacetat, 10 mM Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA), pH 7.0] durch Erhitzen im Mikrowellenofen gelöst, auf 50°C abgekühlt, mit 8 ml 37% Formaldehyd und 6 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) versetzt und in eine RNase-freie Gelapparatur (28 cm x 16 cm) gegossen. Jeweils 10 µg Gesamt-RNA wurden in 10 µl RNase-freiem Wasser gelöst, mit 20 µl entionisiertem Formamid, 10 µl Formaldehyd, 5 µl 1x MOPS/EDTA versetzt und 15 min bei 65°C denaturiert. Nach der Zugabe von 5 µl Bromphenolblau-Auftragspuffer wurden die RNA-Proben auf das Gel aufgetragen und die Elektrophorese bei 4V/cm durchgeführt, bis die Farbstoffbande 20 cm in das Gel eingewandert war. Die aufgetrennte 18S und 28S rRNA konnte aufgrund des interkalierten Ethidiumbromids unter UV-Licht photographiert werden. Die RNA wurde anschliessend durch „horizontalen Abwärtskapillartransfer“ mit 20x SSC-Puffer [3M Natrium-Chlorid/0.3M Natrium Citrat Pufferlösung (SSC)] auf eine Nylonmembran übertragen.

3.7.3. Sequenzgel (Harnstoff-Polyacrylamidgel)

Die Auftrennung der Fluoreszenz-markierten PCR-Produkte (siehe Punkt 3.4.5) erfolgte in 6 % Harnstoff-Polyacrylamidgelen und die Elektrophorese wurde in einem Licor-Sequenzierungsautomat (MWG-Biotech) durchgeführt. Bei der Vorbereitung des Gels wurde standard Protokolle (Ausubel et al., 1994) bzw. die Vorschrift des Herstellers (Episcience Technologies) gefolgt.

3.8. RNase Protection Assay

3.8.1. Synthese der antisense RNA-Sonde

Radioaktive antisense-mRNA-Sonden für RNase Protection Assay wurden durch *in vitro* Transkription in Gegenwart von [α -³²P] UTP (3000 Ci/mmol) erzeugt. Dabei wurde das *in vitro* Transkriptionssystem von Pharmingen benutzt. Als Template wurde das Exon 1 des hCATL, nämlich die gesamte 5'-UTR der hCATL-A mRNA verwendet. Zuvor wurde dieses Fragment mit der Sequenz des T7-Promotors in antisense Richtung angeschlossen (siehe Punkt 3.6.3), damit das Template in antisense Richtung transkribiert wird. Bei der Reaktion der *in vitro* Transkription und bei der Reinigung der antisense RNA-Sonde durch DNase-Verdau, Phenol-Chloroform-Extraktion und Ammoniumacetat-Fällung sowie Ethanol-Waschen wurde den Vorschriften des Herstellers gefolgt. Anschliessend wurde die Spezifität der antisense RNA im Liquid-Scintillation-Spektrometer (Liquid Scintillation Counter-LSC) gemessen.

Es war wichtig die Bedingungen zu optimieren, damit ein Abbruch der RNA-Synthese vermieden wird (frühzeitige Termination). Dieser vorzeitige Abbruch kann durch die Zugabe von kaltem

Nukleotid vermindert werden. Eine Cytidin-Uridin (CU) reiche Sequenz, die direkt im Anschluss an den T7-Promotor sitzt, kann auch zum vorzeitigen Abbruch führen. Nach einigen Versuchen wurde der pCR2.1-TOPO-Vektor (Invitrogen) ausgewählt, da dieser Vektor nicht nur eine optimale Sequenz für diesen Zweck anbietet, sondern tatsächlich auch eine homogene RNA-Sonde produziert. Die Sequenz für die Matrizen-cDNA konnte auch optimiert werden, indem ein Primer mit dem T7-Promotor durch PCR in das cDNA-Fragment eingebaut wurde.

3.8.2. Analyse durch RNase Protection Assay

Jeweils 10 µg Gesamt-RNA wurden in 8 µl Hybridisierungspuffer (Pharmingen) gelöst und mit 2 µl radioaktiver antisense RNA-Sonde mit der spezifischen Aktivität von 2×10^5 Cherenkov counts/µl zusammengegeben. In den weiteren Schritten wurde ein System für RNase Protection Assay von Pharmingen verwendet und den Vorschriften des Herstellers gefolgt. Dabei erfolgte die Hybridisierung bei 56°C. Nach dem RNase- und Proteinase K-Verdau, der Reinigung durch Phenol-Chloroform-Extraktion und Fällung mit Ammoniumacetat sowie Waschen mit 90% Ethanol wurde das Pellet in 8 µl 1x Auftragspuffer gelöst. Die vor dem Verdau geschützten Fragmente in den Proben wurden auf einem 5 % Harnstoff-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Nach dem Trocknen wurde das Gel auf einem Intensivscreen exponiert. Die Intensität der einzelnen Banden wurde auf dem Phosphorimager (GS-250, Biorad) ausgewertet.

3.9. Analyse der Gesamt-RNA durch Northern Blot

3.9.1. Auftrennung und Transfer der RNA

10 µg Gesamt-RNA wurde zunächst in einem denaturierenden Formaldehyd-Agarosegel aufgetrennt wie in Punkt 3.7.2. beschrieben. Das Gel wurde dann mit 20x SSC Transferpuffer durch „Horizontalen Abwärtskapillartransfer“ auf ungeladene Nylonmembranen (Pall) gebracht. Dabei wurde das Standard-Protokoll verwendet (Ausubel et al., 1994). Die Fixierung der RNA auf der Membran erfolgte durch „cross-linking“ bei 0.5 Joule/cm² am UV-Transilluminator (Biometra).

3.9.2. Erzeugung und Reinigung radioaktiv markierter DNA Sonden

Radioaktive DNA-Sonden für Northern-Analysen wurden mit dem „Random Primed DNA Labeling Beads (-dCTP)“ (Amersham) erzeugt. Die zu markierenden Fragmente wurden zuvor durch Restriktionsenzymverdau ausgeschnitten und durch Agarosegel-Elektrophorese gereinigt (siehe Punkt 3.3.5.). In einem 50 µl Ansatz wurden ungefähr 25 ng denaturierter DNA-Fragment im Gegenwart von 5 µl [alpha-³²P] dCTP (3000 Ci/mmol, Hartmann Analytic) markiert.

Die markierten DNA-Sonden wurden durch eine G50-Spinsäule von nicht-eingebauten Nukleotiden gereinigt. Um eine Spinsäule zu bauen, wurde eine 1 ml Pipettenspitze mit silikonisierter Glasswolle gestopft und in ein 1.5 ml Eppendorfröhrchen gesteckt, dessen Deckel ein Loch aufwies. Die Spitze wurde mit 1 ml autoklavierter 10% G50-Suspension aufgefüllt, in ein 15 ml-Plastikröhrchen gesteckt und für 1 min bei 700 g an einer Tischzentrifuge abzentrifugiert. Diese Spinsäule wurde dann in ein frisches Eppendorfröhrchen gesteckt, mit der neu synthetisierten radioaktiven Sonde versetzt und für 2 min bei 850 g abzentrifugiert. Das Eluat wurde frisch für die Hybridisierung verwendet.

3.9.3. Hybridisierung und Autoradiographie

Die geblottete Nylonmembran wurde 3h bei 42°C in Formamid-Hybridisierungslösung (50 % deionisiertes Formamid, 2x SSC, 10% Dextransulfat, 0.1 % SDS, 250 µg/ml frisch denaturierte Heringssperma-DNA) im Hybridisierungsinkubator (Dunn, Model 310) inkubiert. Dann wurde die denaturierte DNA-Sonde zugesetzt und 16-20 h bei 42°C weiter inkubiert. Anschliessend wurde der Membran ein Mal kurz mit 2x SSC und 2 Mal 15 min mit 0.2x SSC, 0.1% SDS bei 65°C gewaschen.

Die getrocknete Membran wurde in Haushaltsfolie eingewickelt, auf dem intensiven ³²P-Screen exponiert und am Phosphoimager (Biorad) ausgewertet. Die Intensität der Banden wurde mit einem Computer-Program „*Molecular Analyst*“ ausgewertet.

3.10. *In vitro* Translation und Analyse der hCATL-cDNA's

Als *in vitro* Translationssystem diente eine *TNT[®] coupled rabbit reticulocyte lysate* (RRL) (Promega), in dem die Transkription und die Translation miteinander gekoppelt sind. Zuvor wurden die vollständigen cDNAs der hCATL-A, -A2 und -A3 mRNA in den pcDNA3.1(+)-Vektor inkloniert, damit der T7-Promotor in Vektor für die RNA-Synthese benutzt werden konnte. Die Translation im RRL erfolgte durch die Zugabe von T7-RNA-Polymerase, Plasmid-DNA, NTPs und Aminosäure ohne Methionin, und die Translationsprodukte wurden in Gegenwart von [α -³⁵S] Methionin markiert. Dabei wurde der Vorschrift des Herstellers gefolgt. Der Anteil des Lysats in diesem 50 µl Ansatz betrug ungefähr 54 %.

Nach der Translation wurde das neusynthetisierte hCATL-Protein durch SDS-PAGE aufgelöst und analysiert. Dazu wurden 5 bzw. 10 µl Lysat entnommen, 5 min bei 95°C mit 10 µl SDS-Probenpuffer denaturiert und anschliessend auf einem 12% Polyacrylamidgel aufgetragen. Als Molekular-grössen Marker wurde ein mit ¹⁴C-markierter Protein-Standard verwendet. Die Elektrophorese wurde unter standardisierten Bedingungen durchgeführt (Ausubel et al., 1994). Das Gel wurde danach im Geltrockner für 60 min bei 80°C und 0,8 Bar getrocknet, einige Stunden bis ein paar Tage auf dem ³⁵S-Screen exponiert und anschliessend am Phosphoimager ausgewertet.

3.11. *In vivo* Expression und Analyse des hCATL

3.11.1. Optimierung der Transfektion

Die HEK293- bzw. BHK21-Zellen wurden 6-7 Tage bei niedriger Zelldichte kultiviert, denn die Transfektion könnte eventuell durch eine Wachstumshemmung aufgrund der Zellkontakte gestört werden. Die Optimierung des Transfektionsversuchs wurde mit verschiedenen Parametervariationen durchgeführt. Diese sind die Zelldichte, die Inkubationszeit der Zellen mit dem Transfektionsmittel, die Konzentration der Plasmid-DNA, die Menge des Transfektionsmittels DOTAP, Fugiene-6 (Roche) und SuperFect (Qiagen). Bei allen Versuchen wurde der Reportergenvektor d2EGFP-N1 (Clontech) verwendet und die Fluoreszenz des Reporters GFP (*green fluorescent protein*) am Fluorimeter gemessen (siehe auch Punkt 3.13.4.). Die Photo-Aufnahmen der transfizierten bzw. nicht-transfizierten Zellen wurden durch das Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss, Jena) geführt und die Bedienungsanleitung des Herstellers gefolgt.

3.11.2. Transiente Transfektion und Zellyse

Um die pcDNA3.1-Konstrukte mit den vollständigen cDNAs des hCATL zu exprimieren, wurden entweder BHK21- oder HEK293-Zellen transient transfiziert. Die Transfektion der HEK293-Zellen mit dem Transfektionsmittel DOTAP wurde auf gleiche Weise durchgeführt wie beim Punkt 3.13.2 beschrieben. Bei der Transfektion der BHK21-Zellen wurden $1.5\text{--}2.0 \times 10^6$ Zellen in 75 cm^2 -Kulturflaschen am Vortag eingesetzt. Als Transfektionsmittel diente Fugiene-6 (Roche). Ein Transfektionsansatz für eine Flasche enthält $6\text{ }\mu\text{g}$ Plasmid-DNA ($3\text{--}4\text{ }\mu\text{l}$), $368\text{ }\mu\text{l}$ Serum freies Medium und $32\text{ }\mu\text{l}$ Transfektionsmittel. Dieses Gemisch wurde 20 min bei Raumtemperatur inkubiert und auf die Zellen gegeben, die zuvor mit 3.6 ml Serum-haltigem frischem Medium versetzt waren. Nach einer 16-stündigen Inkubation im Brutschrank wurde die Zellschicht 2 mal mit PBS gewaschen und mit 4 ml frisches Medium versetzt.

Nach 20-24 Stunden wurden die Zellen geerntet. Dabei wurden die Zellen mit Trypsin/EDTA-Lösung abgelöst und abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit einem Lysispuffer gelöst, welcher 0.5% NP-40, 0.05% SDS, 150 mM NaCl, 50 mM Tris.HCl und 2 mM EDTA enthielt. Nach einem Frier-Tau-Schritt wurde das Zelllysate zweimal 15 sec mit Sonoplus-HD200 (Bandelin Electronic) ultrabeschallt und 15 min bei $20,000g$ und 4°C abzentrifugiert. Im Überstand wurde der hCATL-Proteingehalt des durch ELISA (*Enzyme Linked Immune Sorbent Assay*) bestimmt. (Dieser hCATL-ELISA wurde von Frau Günther im Institut für Physiologische Chemie der Universität Halle-Wittenberg durchgeführt und wird jetzt als Kit der Firma Labsoft angeboten.)

3.12. Analyse der mRNA-Stabilität

Die mRNA-Stabilität der hCATL-Spleissvarianten wurde durch Northern Blot untersucht. Dazu wurden die HEK293-Zellen mit den pcDNA3.1 Konstrukten mit hCATL-A, -A2 und -A3 cDNAs transient transfiziert (siehe Punkt 3.13.2). Actinomycin D ($8\text{ }\mu\text{g/ml}$) bzw. DRB (5,6- chloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole, $20\text{ }\mu\text{g/ml}$) wurden als RNA-Polymerase-Inhibitor verwendet. Dabei wurden die beiden Inhibitoren in DMSO gelöst, und 20-24 Stunden nach der Transfektion wurde Inhibitor in einer Konzentration von $8\text{ }\mu\text{g}$ Actinomycin D/ml bzw. $21\text{ }\mu\text{g}$ DRB/ml Medium zu den transfizierten Zellen zugesetzt. Nach der Zugabe wurden die Zellen zu bestimmten Zeitpunkten geerntet und die Gesamt-RNAs isoliert wie im vorigen Abschnitt beschrieben (siehe Punkt 3.3.3). Die weitere Analyse wurde mit Northern Blot durchgeführt, wie im Punkt 3.9 beschrieben. Nach der Auswertung der radioaktiven Banden am Phosphorimager wurden die Halbwertszeiten ($\text{RNA}_{t/2}$) nach folgender Formel berechnet:

$$\text{RNA}_{t/2} = -\Delta t / \Delta \ln C_t * \ln 2$$

C_t : counts.

3.13. GFP-Reportergen Assay

3.13.1. Optimierung der GFP-Expression

Um einen optimalen Zeitpunkt nach der Transfektion und die optimale Zelldichte zu finden, bei denen die GFP-Fluoreszenz linear bleibt, wurden zwei verschiedene Versuche durchgeführt. Die anderen Transfektionsbedingungen wurden wie unten beschrieben gewählt (siehe Punkt 3.13.2 und 3.13.3). Bei einem Versuch wurden die HEK293-Zellen mit dem Reportergen-Plasmid pd2EGFP-N1 und Transfektionsmittel DOTAP transient transfiziert. Um die Abhängigkeit der GFP-Expression von der Posttransfektionszeit zu untersuchen, wurden die Zellen im Anschluss an die Transfektion zu bestimmten Zeitpunkten geerntet und die GFP-spezifische Fluoreszenz im

Zellysat bestimmt. Dabei wurden die Standard-Messparameter für GFP-Fluoreszenz verwendet (siehe Punkt 3.13.4.).

Beim anderen Versuch wurden die Zellen mit verschiedenen Dichte ausgesät. Nach der Transfektion mit dem Plasmid-DNA (1.5 µg DNA pro 12.5 cm² Kulturflasche) wurden die Zellen geerntet und die Fluoreszenz gemessen. Nach drei unabhängigen Versuchen wurde für jeden Parameter eine Grafikanalyse durchgeführt.

3.13.2. Transiente Transfektion der GFP Genkonstrukte

48h vor der Transfektion wurden 5×10^5 Zellen in 25 cm²-Kulturflaschen ausgesät. Für einen Transfektionsansatz in 2 ml Serum-freiem Medium wurden 3 µg Plasmid-DNA und 24 µg Transfektionsmittel DOTAP eingesetzt. Zuvor wurden die Plasmid-DNA und DOTAP in jeweils 100 µl 20mM Hepes/150 mM NaCl Lösung verdünnt. Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden 1,8 ml Serum-freies Medium zugesetzt. Dieses Transfektionsgemisch wurde zu den Zellen gegeben, nachdem das alte Serum-haltige Medium entfernt und die Zellen einmal mit PBS gewaschen worden war. Nach 6 Stunden Inkubation bei 37°C und 7,5 % CO₂ im Brutschrank wurden die Zellen mit 5 ml Serum-haltigem Medium versetzt und weiter gezüchtet.

3.13.3. Zellernte für die Gesamt-RNA und Zellysat

Der Zellernte erfolgte 20-24 Stunden nach der Transfektion. Die Flaschen wurden zunächst in zwei Gruppen so verteilt, dass eine von zwei hintereinander ausgesäten und mit dem gleichem Plasmid transfizierten Flaschen für Gesamt-RNA Isolierung und die andere für Herstellung der Zellysate diente. Dabei wurde das Medium entfernt und die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen. Für die Gesamt-RNA Präparation wurden die Zellen direkt in der Flasche mit dem 1.5 ml Trizol-Reagenz (Gibco BRL) lysiert und die Gesamt-RNA isoliert wie in Punkt 3.1.1 beschrieben.

Für die Präparation des Zellysats wurden die Zellen auch direkt mit 1.5 ml Hypotonlysispuffer, welcher 11 mM NaCl, 3 mM KCl, 4 mM Na₂HPO₄, 2 mM KH₂PO₄, 1 mM EDTA, 2 mM PMSF (frisch), 2 mM Iodacetamid (frisch) enthält, in der Flasche gelöst und bei -70°C eingefroren. Nach einmaligem Frier-Tau-Schritt wurde das Zellysat zweimal 15 sec mit Sonoplus-HD200 (Bandelin Electronic) ultrabeschallt und 30 min bei 20,000g und 4°C zentrifugiert. Im Überstand wurde die GFP-spezifische Fluoreszenz am Fluorimeter (Perkin-Elmer) gemessen.

3.13.4. Bestimmung der GFP-spezifischen Fluoreszenz

500 µl obengenanntes Zellysat wurde mit gleichem Hypotonlysispuffer auf 2.5 ml verdünnt und die Fluoreszenz am Fluorimeter (Perkin Elmer) gemessen. Die Messbedingungen wurden nach Angaben der Hersteller (Clontech) eingesetzt: $\lambda_{\text{ex}} = 488 \text{ nm}$, Spaltbreite = 5; $\lambda_{\text{em}} = 507 \text{ nm}$, Spaltbreite = 10.

3.13.5. Normierung der GFP-Fluoreszenzwerte durch Northern Blot

Um die Werte der Fluoreszenzbestimmung zu normieren, wurde der GFP-mRNA-Gehalt durch Northern Blot untersucht. Die Gesamt-RNAs wurden wie Punkt 3.13.3 beschrieben aufgetrennt, geblotted und anschliessend mit einer GFP-spezifischen cDNA-Sonde hybridisiert. Die radioaktiven Banden wurden dann am Phosphorimager ausgewertet. Um die aufgetragene Menge

der Gesamt-RNAs zu normieren, wurde die Membran nochmals mit einer β -Actin-spezifischen cDNA-Sonde hybridisiert. Zum Schluss wurden die Werte der β -Actin-mRNA als 100 % gesetzt und die Werte der GFP-mRNA wurden darauf bezogen.

4. Ergebnisse

Anlass für die vorliegende systematische Untersuchung zur Rolle der 5'-UTR für die Translationseffizienz war die Diskrepanz von hoher hCATL-mRNA und geringem hCATL-Protein-Gehalt in malignen Nierentumorgeweben gegenüber gesundem Nierengewebe (Chauhan et al., 1993; Kirscke et al., 1997). Unsere Hypothese war, die Ursache bei den verschiedenen Spleissvarianten der hCATL-mRNA zu vermuten. Es gibt bisher keine systematische Untersuchung über das Verhältnis zwischen verschiedenen Spleissvarianten der hCATL-mRNA, ihre Verteilung in den verschiedenen humanen Geweben und Zellen und über ihre Funktion in der Zelle.

In dieser Arbeit wurde nicht nur mit verschiedenen Methoden versucht, unterschiedliche mRNA-Varianten des hCATL quantitativ zu vergleichen, sondern auch verschiedene Genkonstrukte aus der vollständigen cDNAs bzw. der 5'-UTR mit Expressionsvektoren hergestellt, um die Translationsrate der mRNA-Varianten zu vergleichen und die möglichen Sequenzmotive zu identifizieren, die die Translationseffizienz der hCATL-mRNA beeinflussen können.

4.1. Identifizierung einer neuen hCATL-Spleissvariante

Das Gen des hCATL besteht aus 8 Exons und 7 Introns. Die 5'-UTR in der mRNA entspricht dem Exon 1 und einem kleinen Teil des Exons 2. Die 3'-UTR stammt zum Teil aus Exon 7 und dem gesamten Exon 8 (Chauhan et al., 1991). Weitere Isoformen des hCATL-Transkripts wurden auch identifiziert, aber noch nicht funktionell charakterisiert (Rescheleit et al., 1996). Während die hCATL-A und hCATL-B mRNA jeweils aus zwei verschiedenen cDNA Banken kloniert worden waren (Gal et al., 1988; Troen et al., 1988), wurden die hCATL-A1 und -A2 mRNA durch RT-PCR identifiziert und gewonnen (Rescheleit et al., 1996) (Abb. 1A).

In dieser Arbeit wurde durch RT-PCR versucht, die vollständigen cDNAs aller bekannten hCATL-mRNA Varianten zu klonieren. Dabei wurden die Primerpaare nach den bekannten Sequenzdaten der hCATL-A bzw. hCATL-B mRNA aus der Genbank entworfen. So entsprachen die sense Primer einer Sequenz vom 5'-Ende der hCATL-A bzw. hCATL-B mRNA, während die antisense Primer komplementär zu den 3'-Enden der beiden mRNAs waren. Als template diente eine Einzelsträng-cDNA, die aus Gesamt-RNA eines Nierentumorgewebes durch Reverse Transkription synthetisiert wurde (siehe Methoden Punkt 3-4).

Durch die Klonierung und Sequenzierung wurden drei cDNA Fragmente (1575, 1485 und 1429 Nukleotide) als Spleissvarianten von hCATL-mRNA identifiziert (Abb. 1A). Die beiden grössten Formen hCATL-A und hCATL-A2 erwiesen sich nach der Sequenzierung als identisch zu den bereits beschriebenen Varianten (Gal et al., 1988; Rescheleit et al., 1996). Die dritte und kürzeste Form ist eine neue und bisher unbekannte Form der hCATL-mRNA, die im folgenden als hCATL-A3 bezeichnet wird.

Die hCATL-A und -A2 sowie die neue Spezies hCATL-A3 unterscheiden sich in der 5'-UTR, die aus dem Exon 1 stammt. Das Exon 1 ist bei der hCATL-A mRNA noch 278 nt lang. Durch alternatives Spleissen wurde das Exon 1 bei der hCATL-A2 und -A3 mRNA jeweils auf 188 und 132 nt verkürzt (Abb. 1A). Darüberhinaus ist die AG/GU Konsensus-Sequenz für eine alternative 5'-Spleissstelle bzw. Exon-Intron-Verbindungsstelle nur an den Stellen 278, 188, 132 nt im Exon 1 vorhanden (Abb. 1B).

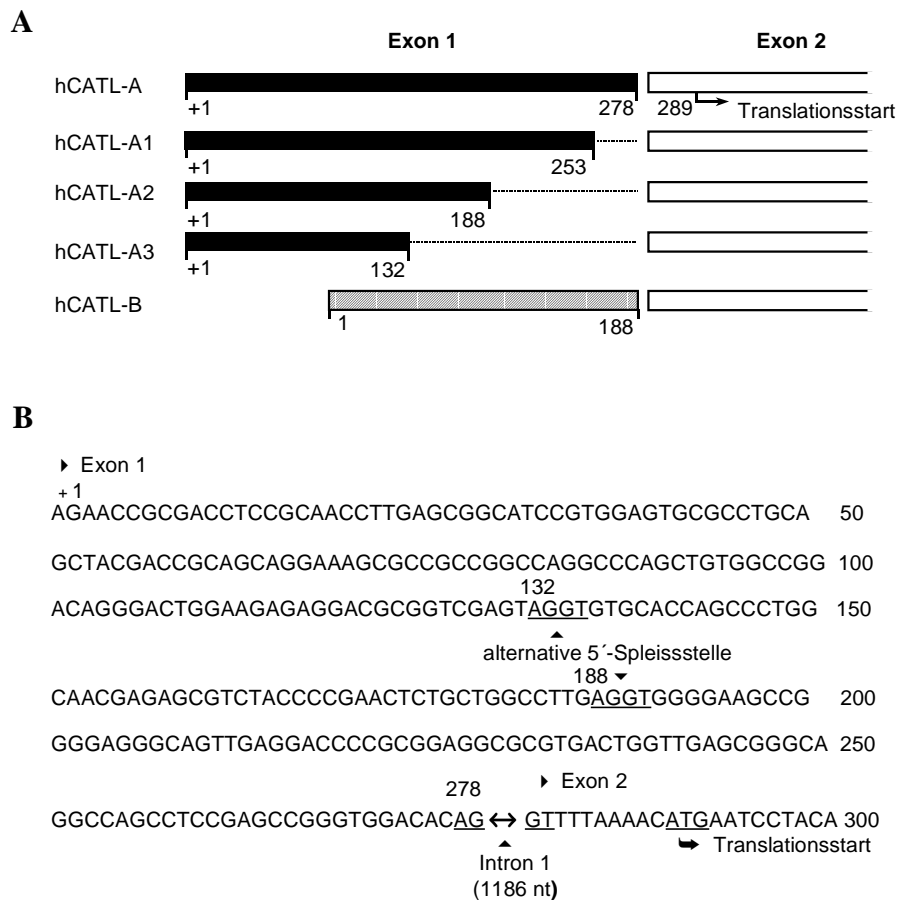


Abb. 1 Struktur der Spleissvarianten von hCATL-mRNA.

- (A) Verschiedene Spleissvarianten der hCATL-mRNA in der 5'-UTR: hCATL-A (Gal et al., 1988), hCATL-A1, hCATL-A2 (Rescheleit et al., 1996) und die neue Spezies hCATL-A3 sowie die hCATL-B (Joseph et al, 1988). Die Nummerierung wurde ab der Transkriptionsstartstelle (+1) des hCATL-Gens gezählt.
- (B) Die Auflistung vom Exon 1 bis zum Exon 2. Die Startstelle des Exons (►), Exon/ Intron Verbindungsstelle (▼) und das Startsignal für hCATL-Translation sowie die alternative 5'-Spleissstellen (▲ ▼) sind in der schematischen Darstellung (A) bzw. in der Auflistung (B) gezeigt.

Das bedeutet, dass alternative Spleissen der hCATL-mRNA nur an den nur bisher beschriebenen Stellen wahrscheinlich ist.

4.2. Charakterisierung der cDNA-Enden (mRNA-Enden) der Spleissvarianten durch RACE-PCR

Mit der neuen Variante hCATL-A3 sind nun 5 verschiedene Isoformen bzw. Spleissvarianten der hCATL-mRNA beschrieben worden, die sich in der 5'-UTR unterscheiden (Abb. 1A). Es wurde bisher noch nicht beschrieben, ob die Enden der bekannten cDNAs tatsächlich die Startstelle bzw. das Ende der Transkription waren. Durch die 5'- bzw. 3'-RACE-PCR sollte im folgenden untersucht werden, ob alle bekannten Enden der verschiedenen cDNA-Sequenzen mit der Transkriptionsstartstelle bzw. dem Ende der 3'-UTR identisch sind, oder ob es Variationen an den 5'- bzw. 3'-Enden gibt.

4.2.1. 5'-RACE-PCR für hCATL-mRNA

Die 5'-UTRs der hCATL-A, -A1 und -A2 mRNA entstammen alle dem Exon 1. Die 5'-UTR der hCATL-B mRNA ist dagegen nur ein 188 nt langes Fragment aus dem 3'-Ende des Intron 1 (Abb. 1A). Da alle bekannten Varianten in der kodierenden Region identisch sind, können ihre 5'-UTR Sequenzen mit einem antisense Primer in den Exons 2 bis 7 durch 5'-RACE-PCR amplifiziert werden. Deswegen wurden drei Primer in Exon 2 des hCATL-Gens entworfen, die in antisense Richtung orientiert waren (Abb. 2A), um die 5'-Enden der hCATL-Transkripte zu detektieren. Die erste-Strang-cDNA-Synthese erfolgte mit dem ersten hCATL-spezifischen Primer (sp1). In den nächsten Schritt wurden die 5'-Enden dann mit einem poly(C)-Schwanz durch Terminal-deoxynucleotidyl-Transferase verlängert, was eine höhere *Annealing*-Temperatur für die nachfolgenden *nested*-PCR erlaubt (siehe Punkt 3.4.4, Methode). Mit dem dritten genspezifischen Primer (sp3) wurden sichtbare und klar aufgetrennte PCR-Produkte auf dem Agarosegel beobachtet (Abb. 2B). Mindestens drei verschiedene Fragmente konnten identifiziert werden.

Das grösste und das kleinste Fragment von 390 bzw. 254 nt entsprachen der Grösse nach den Spleissvarianten hCATL-A und A3, inklusive der ca. 50 nt, welche durch *poly (C)-tailing* und *nested*-Primer UAP (*universal anchor primer*) eingefügt waren (siehe Punkt 3.4.4.1, Methoden). Daher könnten die bisher bekannten 5'-Ende der beiden mRNA Varianten auch tatsächlich dem Transkriptionsstart entsprechen.

Die PCR-Produkte wurden direkt aus dem Reaktionsansatz, ohne vorherige Gelreinigung in den pCR2.1-TOPO-Vektor (Invitrogen) einkloniert und sequenziert. Die Sequenzierung erfolgte nur von jeweils der Seite des genspezifischen Primers, da durch das *poly (C)-tailing* am 5'-Ende der cDNA die Sequenzierungsreaktion stark beeinträchtigt war.

Die Sequenzanalyse bestätigte, dass die Spleissvarianten hCATL-A, -A2 und -A3 tatsächlich mit den bereits bekannten 5'-Enden amplifiziert wurden. Überraschenderweise ergab die Sequenzanalyse verschiedener isolierter Klone mindestens noch zwei andere Fragmente, die durch die Verkürzung des Exon 1 am 5'-Ende um jeweils 38 bzw. 88 Nukleotide entstanden waren (Abb. 3C). Ob es sich hierbei um unvollständig amplifizierte 5'-Enden der mRNA während der RACE-PCR handelt oder ob diese verkürzte Sequenzen physiologische Bedeutung haben, ist bislang ungeklärt (siehe Diskussion).

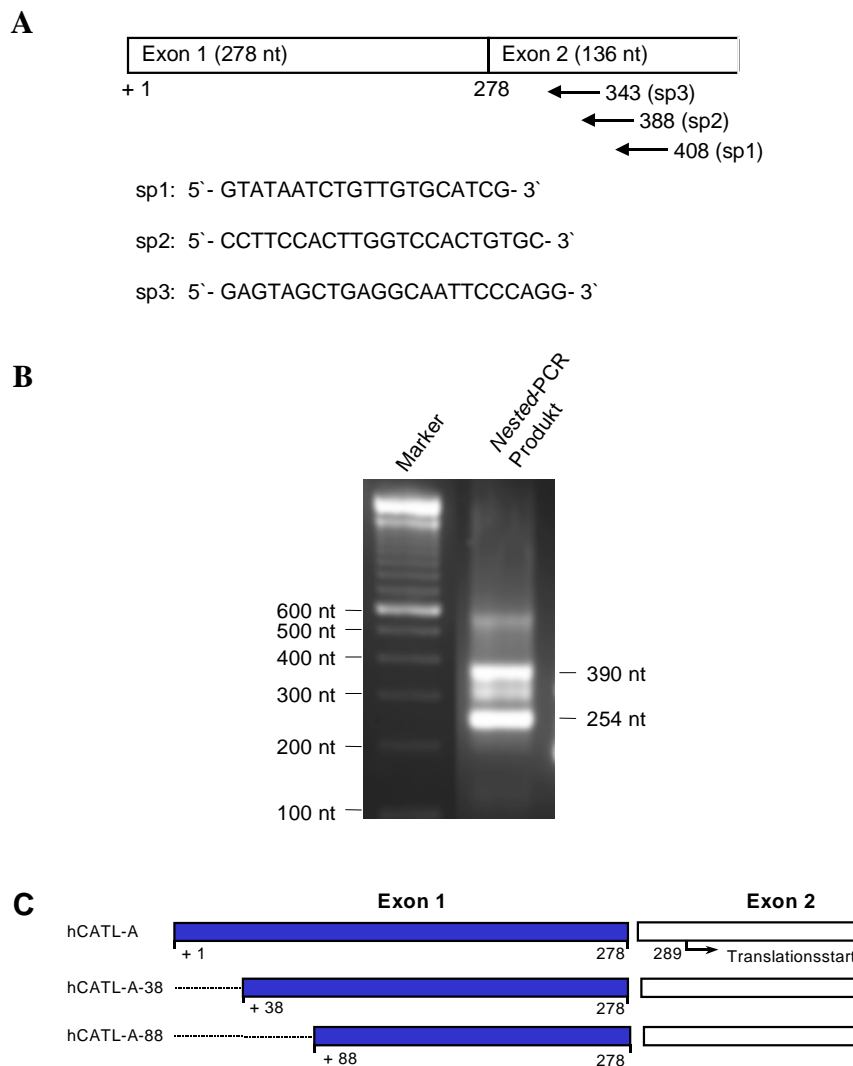


Abb. 2 5'-RACE-PCR für hCATL-mRNA.

- (A) Schematische Darstellung von drei hCATL-spezifischen antisense Primern sp1, sp2 und sp3 in Exon 2, deren Sequenz zu den Bereichen 408 → 343 der hCATL-A mRNA komplementär ist und an der angegebenen Stelle anfängt.
- (B) Durch sp1 erfolgte die cDNA-Synthese aus der Gesamt-RNA eines malignen Nierentumorgewebes. Mit den sp2 und sp3 wurden die erste PCR und die *nested*-PCR durchgeführt, und dabei diente ein sogenannte Primer UAP (*universal anchor primer*) als sense Primer (siehe Punkt 2.4.3, Methoden).
 Spur1: DNA-Größenstandard;
 Spur2: *nested*-PCR Produkt mit dem Primer sp3 und UAP.
- (C) Struktur der zwei neuen hCATL-mRNA-Formen, die durch 5'-RACE-PCR identifiziert wurden. Die Nummerierung wurde für hCATL-A (Gal et al., 1988) ab der Transkriptionsstartstelle (+1) des hCATL-Gens gezählt, während für die neue Spezies hCATL-A-38 bzw. hCATL-A-88 ist abweichend dargestellt.

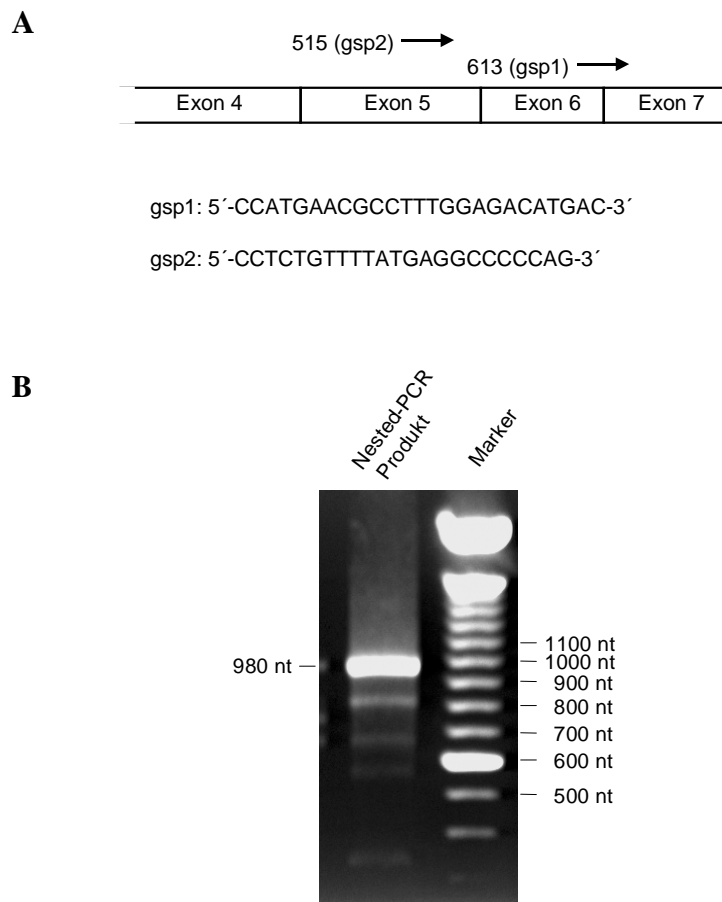


Abb. 3 3'-RACE-PCR für hCATL-mRNA.

- (A) Schematische Darstellung der Position von zwei hCATL-spezifischen sense Primern gsp1 und gsp2 in Exon 4 bzw. in Exon 5.
- (B) Durch einen Oligo (dT)₁₈-Anchor Primer erfolgte die cDNA Synthese von Gesamt-RNA aus einem Nierentumorgewebe. Mit den gsp1 und gsp2 wurde die erste PCR und *nested*-PCR durchgeführt. Dazu wurde ein *Anchor-Primer* als antisense Primer eingesetzt (siehe auch Punkt 2.4.3, Methoden).

Spur1: PCR-Produkt durch zweimalige Nacheinander-Amplifikation zunächst mit dem Primer gsp1 und danach mit gsp2 (*nested*-PCR);

Spur2: DNA-Größenstandard.

4.2.2. 3'-RACE-PCR für hCATL-mRNA

Zwei hintereinander liegende hCATL-spezifische Sequenzen wurde als sense Primer gewählt, um die 3'-UTR der hCATL-Transkripte mit 3'-RACE-PCR zu amplifizieren (Abb. 3A). Nach der cDNA-Sequenz der hCATL-A aus der Genbank beginnen die beiden genspezifische Primer bei der Nukleotidstelle 513 (gsp1) bzw. 615 (gsp2). Nach der cDNA-Synthese mit dem *Oligo (dT)₁₈-Anchor Primer* wurden zwei aufeinanderfolgende *nested*-PCRs mit dem *Anchor* Primer und den beiden genspezifischen Primern gsp1 und gsp2 durchgeführt. Sowohl nach der Grösse des dominierenden PCR-Fragments (980 nt) auf dem Gel (Abb. 3B) als auch durch Klonierung und Sequenzierung dieses Fragments wurde sichergestellt, dass die 3'-Enden der verschiedenen Varianten identisch waren.

4.3. Gewebeverteilung der Spleissvarianten bei RT-PCR

Wie aus der Abb. 1A und B zu entnehmen ist, können die Spleissvarianten hCATL-A, -A2 und die neue Spezies hCATL-A3 parallel durch RT-PCR amplifiziert werden, da das PCR-Primerpaar offensichtlich ausserhalb des Bereichs für alternatives Spleissen liegt (siehe Diskussion). Um die Verteilung der Spleissvarianten in verschiedenen Geweben und Zellen zu untersuchen, wurde ein sense Primer in der Nähe des 5'-Endes des Exon 1 und ein antisense Primer in der Mitte des Exon 4 für die RT-PCR eingesetzt (Abb. 4A). Auf diese Weise konnte Gesamt-RNA aus verschiedenen Geweben und Zellen untersucht werden (Abb. 4B, C und D).

Als Produkt der RT-PCR-Reaktion waren auf dem Agarosegel bis zu vier Banden zu detektieren; jedoch entsprachen nur drei Fragmente der Grösse der hCATL-A, -A2 und -A3 mRNA. Die zweit grösste Bande (~555 Nukleotide) kann nach ihrer Grösse noch nicht die hCATL-A1 sein. Die weitere Sequenzanalyse hat erwiesen, dass diese Fragment ein Artefakt der cDNA Synthese war.

Eine semi-quantitative Auswertung aller Banden war schwierig, da die grösseren Banden meistens besonders schwach waren. Trotzdem ist deutlich, dass die kürzeste Bande, die der neun Spezies hCATL-A3 entsprach, in allen untersuchten Geweben und Zellen dominierte. Darüberhinaus lassen sich in der Intensität der drei Banden untereinander keine Unterschiede zwischen peripherem Nierentumor und normalem Nierengewebe beobachten. Das bedeutet, dass in der Wachstumszone des Tumors ähnliche quantitative Verhältnisse zwischen den drei Formen herrschen wie im gesunden Gewebe.

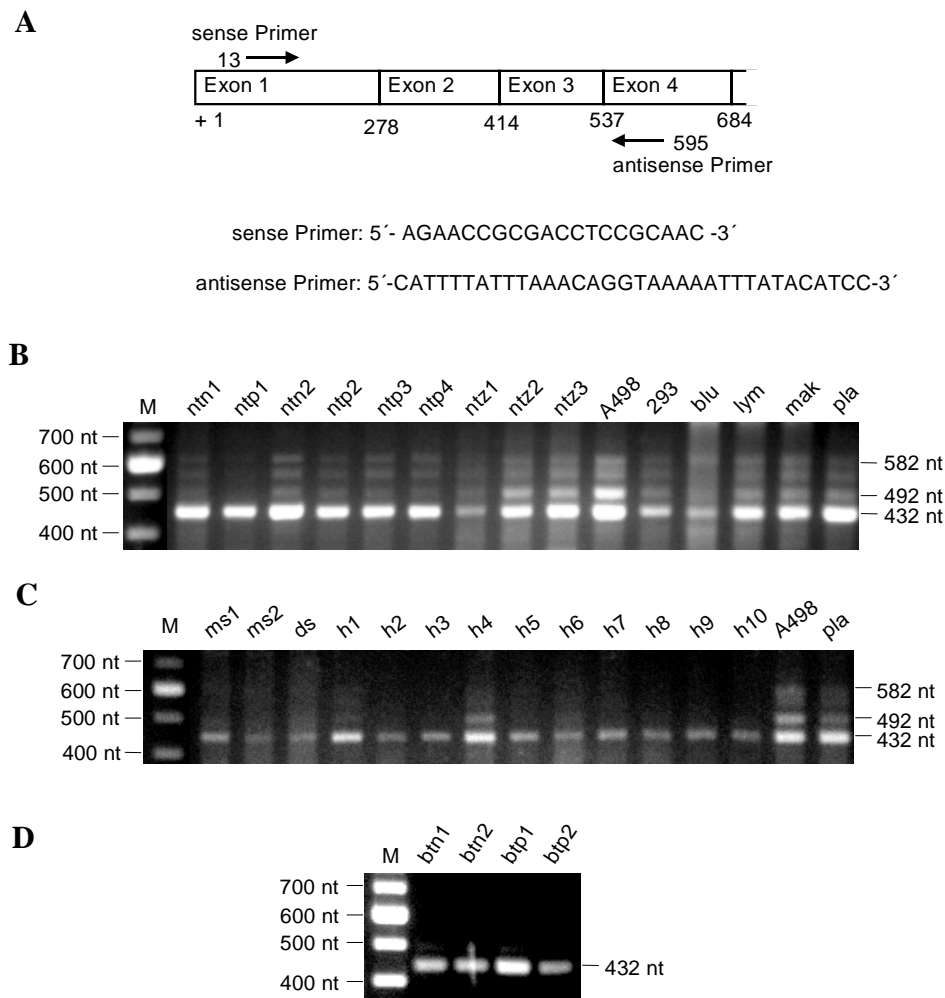


Abb. 4 Die Verteilung der hCATL-mRNA in verschiedenen Geweben und Zellen durch RT-PCR.

Als ein Primerpaar für die PCR wurden ein sense Primer am 5'-Ende des Exon 1 und ein antisense Primer im Exon 4 des hCATL-Gens entworfen (A). Die Gesamt-RNAs aus verschiedenen Geweben und Zellen (B, C und D) wurden zunächst durch *Oligo (dT)₁₈-Primer* revers transkribiert und dann durch die angegebenen Primerpaare amplifiziert. Die eingesetzten Gesamt-RNAs sind in folgender Tabelle beschrieben

Abgekürzte Namen	Beschreibung	Abgekürzte Name	Beschreibung
M	DNA Grössenstandard	pla	Plazentagewebe
ntn	Nierentumorgewebe, normale Gewebezone	ms	Brusttumor-normale Gewebezone
ntp	Nierentumorgewebe, peripherie Tumorzone	ds	Brusttumor, periphere Tumorzone
ntz	primärer Nierentumor Zellkultur	h	Magenschleimhaut
A498	Nierentumor Zelllinie	btn	Duodenumschleimhaut
HEK293	humane embryonale Nieren Zelllinie	btp	Hautgewebe mit Entzündung
blu	Gesamt-Blutzellen	lym	Lymphozyten aus Blut

4.4. Semi-quantitative Darstellung der Spleissvarianten durch RNase Protection Assay

Um die verschiedenen Spleissvarianten im Gewebe semi-quantitativ darstellen zu können, wurde ein RNase Protection Assay gewählt. Hierbei schützt eine antisense RNA-Sonde durch Hybridisierung die Ziel-RNA vor dem RNase-Verdau. Eine radioaktiv markierte antisense RNA-Sonde, deren Sequenz komplementär zur gesamten 5'-UTR der hCATL-A mRNA ist, wurde hierfür in diesem Assay eingesetzt. Dabei sollte die Sonde theoretisch mit den 5'-UTRs der verschiedenen mRNA-Spleissvarianten hybridisieren und dieselben Bereiche vor dem RNase-Verdau schützen, so dass bis zu drei RNA-Fragmente in der Grösse von 132, 188, und 278 nt erwartet werden konnten.

In einem Vorexperiment wurde zunächst überprüft, ob die gewählten Parameter einen linearen Bereich für die Auswertung ermöglichen. Dazu wurde sowohl die Menge der eingesetzten RNA als auch der antisense RNA-Sonde variiert (Abb. 5A). Bei einer konstanten Menge der RNA-Sonde (cpm) und nach steigender Menge an eingesetzter RNA nahm die Intensität der Banden linear zu. Bei steigender Menge der RNA-Sonde änderte sich die Intensität der Banden nicht, da wahrscheinlich die Ausgangsmenge der RNA-Sonde (3×10^5 cpm) im Überschuss vorlag. In beiden Fällen blieben die Verhältnisse der kürzesten Form hCATL-A3 zur längsten Form hCATL-A wie erwartet konstant (Abb. 5B und C).

Aus dem Vorversuch wurden optimierte Parameter von 4×10^5 cpm Sonde und 10 µg Gesamt-RNA abgeleitet. Diese Bedingungen wurden in den Folgeexperimenten eingehalten. Unter diesen ermittelten Bedingungen wurden Gesamt-RNAs sowohl aus verschiedenen Tumorzellen als auch aus Geweben untersucht (Abb. 6A, B und C). Die Ergebnisse können wie folgt zusammengefasst werden:

- (1) Alle drei Spleissvarianten kommen *in vivo* in allen untersuchten Geweben vor.
- (2) Anhand der Grössenstandards und der RNA-Sonde konnten drei Fragmente identifiziert werden, die in der Grösse der 5'-UTR der hCATL-A, -A2 und -A3 entsprechen (Abb. 1A). Das Fragment, deren Grösse 188 Nukleotide betrug, entsprach zwar der 5'-UTR der hCATL-A2 mRNA, aber dies konnte auch nach seiner Grösse das 190 Nukleotid-Grosse Fragment sein, das durch 5'-RACE-PCR identifiziert war (siehe Abb. 2C).
- (3) Die kürzeste Variante, bezeichnet als hCATL-A3, dominiert in den untersuchten Geweben und Zellen. Die Intensität der Banden wurde am Phosphoimager quantitativ ausgewertet. Die Werte wurden zunächst auf die Zahl der vor RNase-Verdau geschützter Nukleotide normiert. Daraus ergab sich, dass *in vivo* die kürzeste Form hCATL-A3 in 2 bis 4 facher Menge im Vergleich zur längsten Form hCATL-A vorhanden ist (Tab. 1).
- (4) Im Verhältnis der drei einzelnen Banden untereinander gibt es keine signifikanten Unterschiede zwischen Nierentumoren und normalem Nierengewebe (Tab. 1). Aus mehreren Versuchen konnte gefolgert werden, dass die kürzeste Spleissvariante sowohl in Nierentumoren als auch in normalen Nierengeweben dominiert. In keinem untersuchten Fall, waren andere Formen (hCATL-A oder -A2) höher oder gleich konzentriert als hCATL-A3.

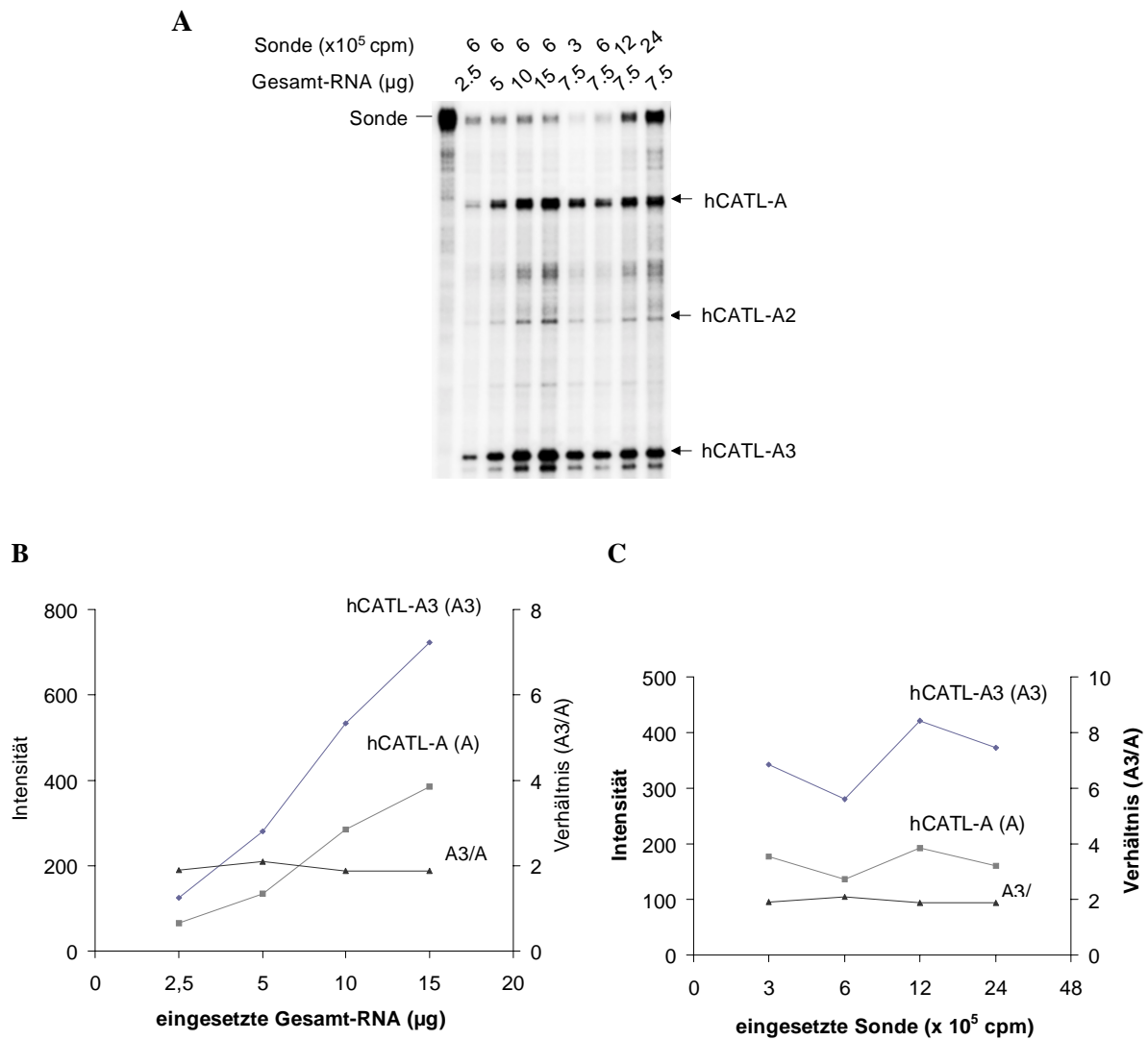


Abb. 5 Bestimmung der Linearität zwischen der RNA-Menge und eingesetzter radioaktiver Sonde im Ribonuklease Protektion Assay.

- (A) Sowohl die Gesamt-RNA aus einem Nierentumorgewebe als auch die [α - 32 P] UTP-markierte radioaktive Sonde wurden in unterschiedlichen Kombinationen für den Assay eingesetzt.
- (B) und (C) Die Mengenverhältnisse von hCATL-A3 zu hCATL-A wurden nach der Intensität der einzelnen Banden am Phosphorimager berechnet und nach Variation der eingesetzten Sonde bzw. RNA-Menge dargestellt.

Darüber hinaus kommen zusätzliche, schwache Zwischenbanden vor (siehe Abb. 6A). Eine davon steht zwischen zwei Banden von hCATL-A und A2, und entspricht nach seiner Grösse dem 240 Nukleotidegrossen Fragment, das durch 5'-RACE-PCR kloniert war (siehe Abb. 2C). Eine andere schwache Bande, die zwischen zwei Banden von hCATL-A2 und -A3 steht, ist uns nicht bekannt. Da diese schwachen Fragmente nicht als vollständige cDNAs kloniert werden konnten, wurden sie auch nicht weiter untersucht.

Tab. 1 Vergleich des mRNA-Gehalts zwischen Form hCATL-A und -A3 in verschiedenen Tumorzellen und einigen Tumorgeweben.

Die Intensität der Banden, die auch in Abb. 4 A, B und C als ein Beispiel gezeigt waren, wurden am Phosphoimager ausgewertet. Das Verhältnis von hCATL-A3 zu hCATL-A wurde für die Tumorzelllinien und Tumorgeweben berechnet und wie folgt aufgelistet.

Zellen /Gewebe	Beschreibung	Verhältnis* von hCATL-A3 zu hCATL-A
97TM1	Lungenkarzinom Zelllinie	2.9
103H	Lungenkarzinom Zelllinie	2.5
HepG2	Leberkarzinom Zelllinie	2.1
MDA-MB3	Mammakarzinom Zelllinie	5.1
HT29	Kolonkarzinom Zelllinie	4.2
HeLa	Cervixkarzinom Zelllinie	2.0
K562	Myeloid Leukämie Zelllinie	2.1
A498	Nierenkarzinom Zelllinie	2.1
Blut	Gesamt-Blut Zellen	1.8
Haut	Hautgewebe	2.7
Plazenta	Plazentagewebe	2.4
Brust-tn	Brusttumor-normale Zone	3.2 (n=2)
Brust-tp	Brusttumor-periphere Zone	4.2 (n=2)
Niere-tn	Nierengewebe-normale Zone	2.6 (n=8)
Niere-tp	Nierentumor-zentrale Zone	2.7 (n=2)
Niere-tp	Nierentumor-periphere Zone	2.9 (n=7)

* Mittelwert aus angegebenen Versuchen.

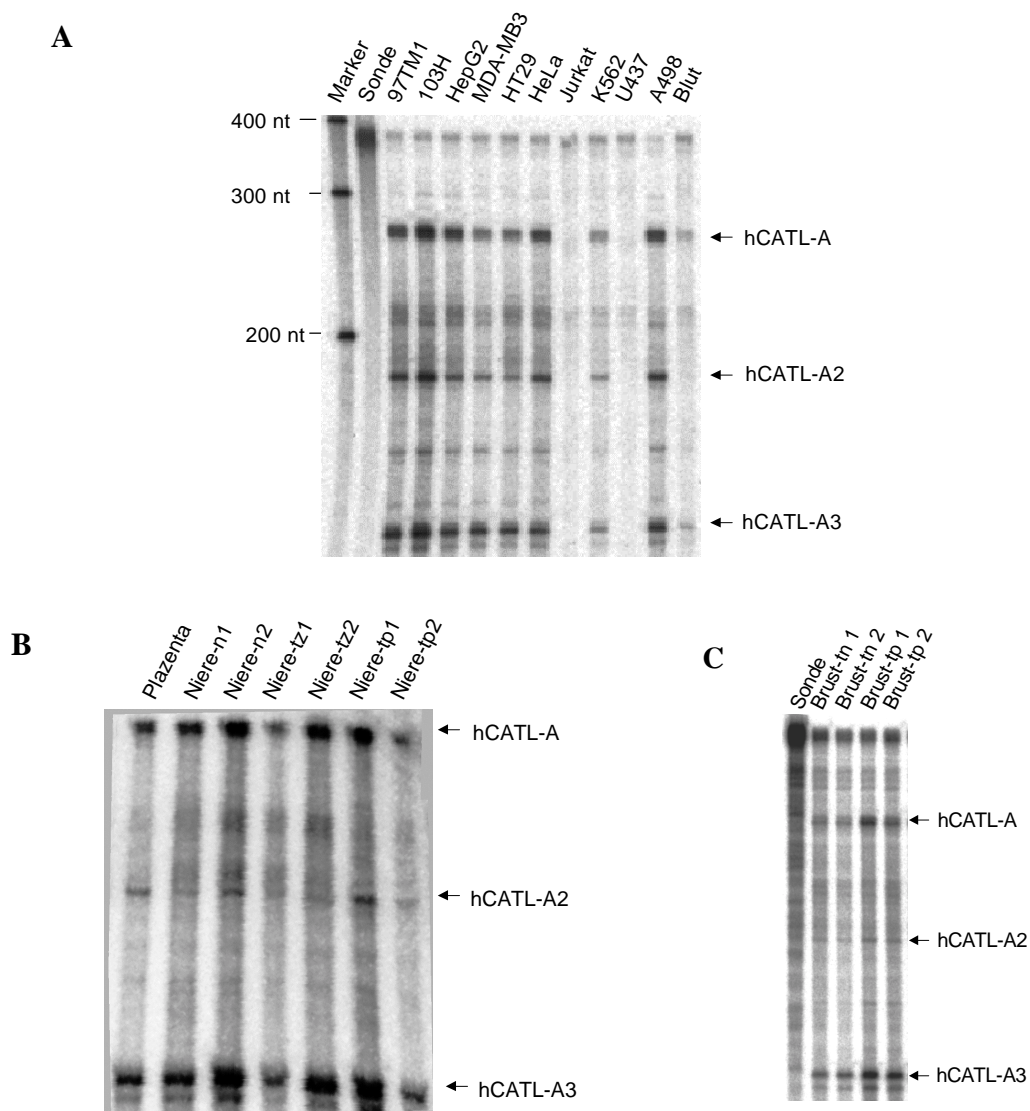


Abb. 6 Analyse des hCATL-mRNA Gehalts in verschiedenen Geweben und Zellen durch Ribonuklease Protektion Assay.

Je 10 µg Gesamt-RNA aus angegebenen Zellen (A) und Geweben (B und C) wurde für den Assay mit einer [α -P³²] UTP markierten antisense RNA-Sonde eingesetzt, deren Sequenz das gesamte Exon 1 des hCATL-Gens (Abb. 1A) in der revers komplementären Richtung umfasst. Nach der Hybridisierung wurden die Proben durch die RNase (A+T1) verdaut und auf dem Sequenzgel aufgelöst (siehe Punkt 2.7., Methoden). Die Pfeile zeigen die geschützten Fragmente, die in der Grösse den 5'-UTRs von verschiedenen Spleissvarianten entsprechen. Die molekularen Massen eines [γ -P³²] ATP markierten DNA Standards sind in Nukleotidenzahl (nt) angezeigt. Die abgekürzten Namen der Gewebe sind: tn= Tumorgewebe/normale Zone; tp- Tumorgewebe/periphere Zone. Die Beschreibungen für die Tumorzelllinien sind in Tabelle 1 erläutert.

4.5. Analyse der mRNA-Stabilität der hCATL-A und -A3 durch Northern Blot

Wie die vorherige Untersuchung durch RT-PCR und RNase Protection Assay zeigte, dominiert die kürzeste Variante hCATL-A3 mRNA in den untersuchten Geweben und Zellen. Aus diesem Vergleich der „steady-state“ RNA-Konzentration lässt sich nicht auf gleiche RNA-Stabilität der einzelnen Varianten schließen. Deshalb wurde die Stabilität der einzelnen hCATL-A und -A3 in transfizierten Zellen durch Northern Blot untersucht.

Da in HEK293-Zellen die endogene hCATL-mRNA zu gering war, um durch direkten Northern Blot analysiert zu werden, wurden die HEK293-Zellen mit den pcDNA3.1(+)-Plasmidkonstrukten der hCATL-A bzw. hCAT-A3 cDNAs transient transfiziert. Um die *de novo* RNA-Synthese zu unterbrechen, wurden als Inhibitoren Actinomycin D (Inhibitor der RNA Polymerase I, II und III) (8 µg/ml) bzw. DRB (5,6-chloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole, Inhibitor der RNA Polymerase II) (21 µg/ml) eingesetzt. Zu dem angegebenen Zeitpunkten nach Inhibitorzugabe wurde die Gesamt-RNA extrahiert und durch Northern Blot untersucht. Die Abb. 7 zeigt deutlich, dass die mRNA-Mengen nach der Inkubation des Inhibitors allmählich verringert werden. Die Auswertung der Banden am Phosphoimager und die Abschätzung der Halbwertszeit nach der Gleichung $RNA_{t/2} = -\Delta t / \Delta \ln C_t \cdot \ln 2$ (siehe Punkt 3.13, Methode) zeigte, dass die Stabilität der beiden mRNA-Varianten ($t/2$) vergleichbar ist und bei etwa 4 Stunden liegt.

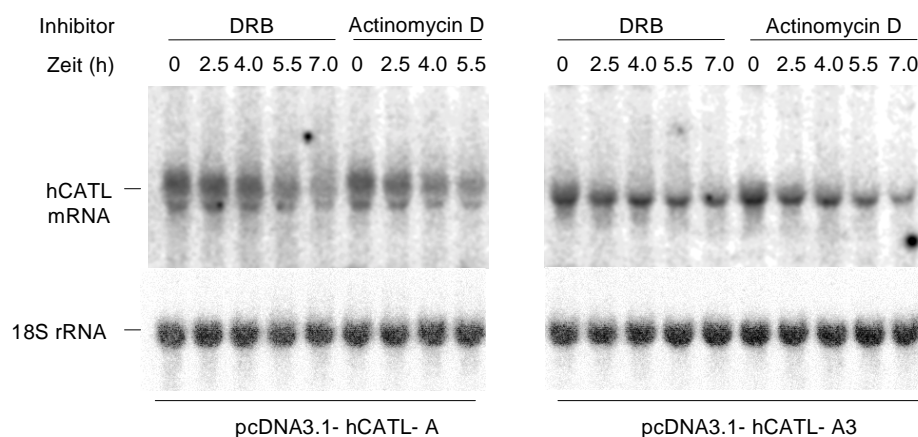


Abb. 7 Bestimmung der mRNA- $t/2$ von hCATL-Spleissvarianten durch Northern Blot.

HEK293-Zellen wurden mit dem Expressionsvektor pcDNA3.1 mit der hCATL-A cDNA bzw. der hCATL-A3 cDNA transient transfiziert (siehe Punkt 3.13.2, Methoden). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen entweder mit Actinomycin D (8 µg/ml) oder DRB (5,6-chloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole, 21 µg/ml) inkubiert, und nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Gesamt-RNAs isoliert. Bei der Analyse durch den Northernblot wurden die hCATL-mRNA bzw. humanen 18S-rRNA mit den entsprechenden cDNA-Sonden detektiert und am Phosphoimager ausgewertet (siehe Punkt 2.10.5, Methoden). Die Zeitpunkte der RNA-Isolierung, die Banden der hCATL-mRNAs bzw. der 18S-rRNA sowie die cDNAs, zu denen die Spuren gehören, sind angegeben.

4.6. *In vitro* Translation der cDNAs der Spleissvarianten hCATL-A, -A2 und -A3

Die Unterschiede der Spleissvarianten der hCATL-mRNA bestehen nur darin, dass sie in der 5'-UTR eine voneinander abweichende Sequenz besitzen, die einen regulatorischen Effekt haben könnte. Ein *cis*-agierendes Element in der 5'-UTR könnte die Translationseffizienz der mRNA entweder positiv oder negativ beeinflussen (siehe Punkt 1.1., Einleitung) (Goossen et al., 1992; Menotti et al., 1998; Paraskeva et al., 1999). Die Stabilität der mRNA kann ebenfalls durch *cis*-agierende Elemente in der 5'-oder 3'-UTR bestimmt werden (Laterza et al., 1997; Linz et al., 1997).

Da die verschiedenen Spleissvarianten den gleichen Leserahmen besitzen, sollten sie das gleiche Translationsprodukt und die gleiche *Precursor* des hCATL-Proteins kodieren. Die *in vitro* Translation ist nicht nur ein schneller Weg um festzustellen, was für ein Protein durch die Translation entstehen wird, sondern es kann auch bis zu einem gewissen Grad eingeschätzt werden, ob die Translation der mRNA bereits *in vitro* reguliert wird (Paraskeva et al., 1999).

In diesem Versuch wurde ein Kaninchen Retikulozytenlysat als *in vitro* Translationssystem verwendet. Da der Volumenanteil des Lysats im Ansatz über 50 % beträgt, ist es nicht auszuschliessen, dass die *trans*-agierenden Translationsfaktoren im Lysat noch ihre Funktionen ausüben können.

Die drei vollständigen cDNAs der Spleissvarianten hCATL-A, -A2 und -A3, welche in den pcDNA3.1-Vektor unmittelbar hinter den T7-Promotor inseriert wurden, wurden in diesem Assay eingesetzt (Abb. 8). Die entstandenen Translationsprodukte wurden durch Zugabe von [³⁵S]-Methionin zum Reaktionsansatz radioaktiv markiert und auf den SDS-PAGE-Gel getrennt. Das getrocknete Gel wurde dann durch Autoradiographie am Phosphoimager analysiert (siehe Punkt 3.10, Methoden). Die Auswertung der radioaktiv markierten Proteinbanden zeigte, dass alle Produkte in der Grösse der bekannten hCATL-Präproenzym (grosse Bande) entsprachen (Abb. 8A). Die kleineren und schwächeren Banden könnten dem Proenzym/*Precursor* des hCATL entsprechen, die durch Abspaltung des Signalpeptids entstanden sein könnten. Die Expression des Translationsproduktes der hCATL-A3 cDNA war mindestens doppelt so hoch im Vergleich zu den anderen beiden Formen hCATL-A und -A2 (Abb. 8B). Somit konnte schon durch einen *in vitro* Translationstest beobachtet werden, dass die kürzeste Spleissvariante (hCATL-A3) viel effizienter translatiert wird als die anderen beiden.

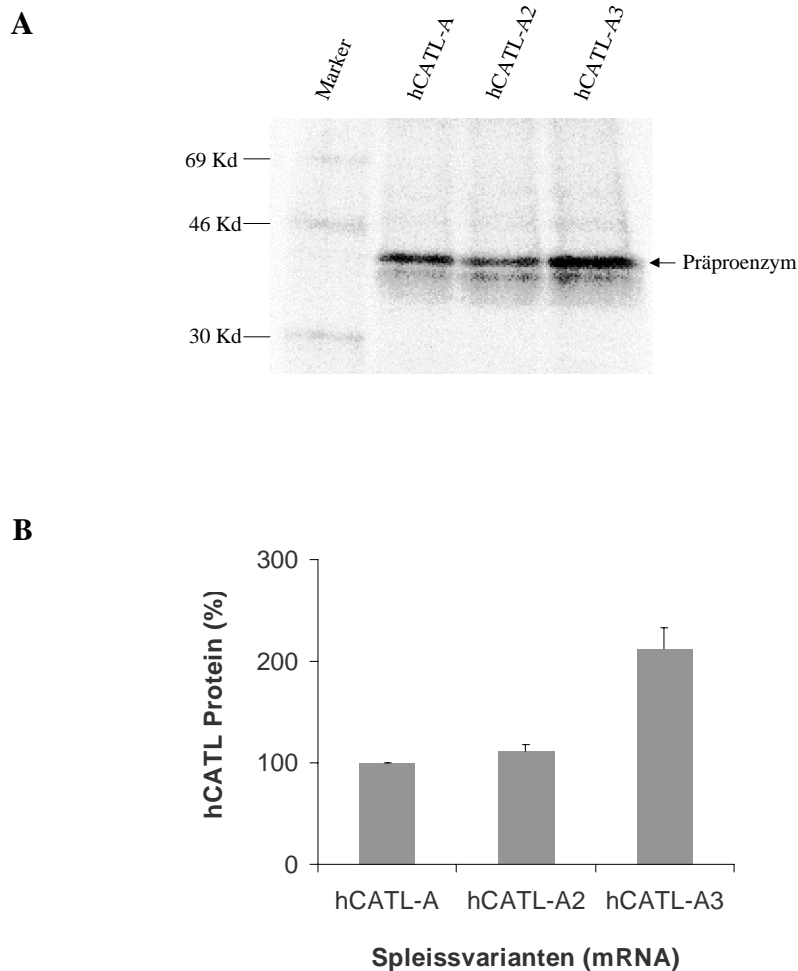


Abb. 8 *In vitro* Translation der hCATL-Spleissvarianten.

Die pcDNA3.1 (+)-Konstrukte mit den cDNAs der angegebenen hCATL-Spleissvarianten wurden in einem gekoppelten Transkriptions/Translationssystem mit Kaninchen Retikulozytenlysat translatiert (siehe auch Punkt 3.10, Methoden).

- (A) Die [α - 35 S]-Methionin markierten Translationsprodukte wurden durch SDS-PAGE aufgelöst und autoradiographiert. Die Positionen eines [14 C]-markierten Proteinstandards sind links angezeigt.
- (B) Die Expression der Spleissvarianten aus der Autoradiographie wurden im Phosphoimager quantifiziert. Die Expression der hCATL-A mRNA wurde als Referenzwert =1 gesetzt und die Expression der anderen Varianten hCATL-A2 und -A3 hierzu ins Verhältnis gesetzt. Dargestellt sind die Mittelwert (\pm Standardabweichung) von 6 unabhängigen Versuchen.

4.7. *In vivo* Expression der vollständigen cDNAs von Spleissvarianten und quantitative Cathepsin L-Bestimmung durch ELISA

Im zellfreien Translationssystem konnte gezeigt werden, dass die Translation der mRNA-Variante offenbar durch *trans*-agierende Faktoren des Zelllysats auf unterschiedliche 5'-UTRs beeinflusst wird. Dies ist jedoch nicht ausreichend, um eine Aussage zu treffen, inwieweit die Translation verschiedener mRNAs in der intakten Zelle reguliert wird, wo manche regulatorische Faktoren zusätzlich durch Membrankompartimente getrennt sind. Darüberhinaus ist es nicht auszuschliessen, dass die Translation einer mRNA noch dadurch beeinflusst wird, dass die verschiedenen mRNA-Isoformen des hCATL subzellulär unterschiedlich lokalisiert sein könnten, denn die 3'-UTR der hCATL-mRNA besitzt zweimal das Sequenzmotiv AUUUA, welches bei manchen anderen Säuger-mRNAs als Lokalisierungssignal festgestellt wurde (Jacobs et al., 1996; Deshler et al., 1998).

Um die Translationsrate der natürlich vorkommenden drei Spleissvarianten hCATL-A, -A2 und -A3 zu untersuchen, wurden sowohl die humane Zelllinie, die HEK293, als auch die nicht-humane Zelllinie, BHK21, mit den entsprechenden vollständigen cDNAs transient transfiziert. Dabei wurde ein Cathepsin-L-ELISA verwendet, um die intrazelluläre Proteinexpression zu quantifizieren. Zuvor wurden die vollständigen cDNAs der verschiedenen Spleissvarianten in den Expressionsvektor pcDNA3.1 (+) einkloniert. Dabei wurde das cDNA-Fragment zwischen den CMV-Promotor und dem BGH-poly(A)-Signal inseriert.

HEK293-Zellen wurden nach Austestung verschiedener Transfektionsreagenzien (DOTAP und Fugiene 6, Roche; SuperFect, Qiagen; Lipofectin, Gibco BRL; Clonfectin, Clontech) mit dem DOTAP-Reagenz unter Serum-freien Bedingungen transfiziert. Abgeschätzt durch das grünfluoreszierende Reporter-Plasmid pd2EGFP-N1 konnte mit diesem Reagenz eine Transfektionseffizienz von ~60% erzielt werden (Abb. 9A und B). Für BHK21-Zellen erwies sich das Transfektionsreagenz Fugiene-6 (Roche) unter Serum-haltigen Bedingungen als optimal mit einer Transfektionseffizienz von bis zu 30 % (Daten nicht gezeigt).

Während die mock-transfizierten (nativ) BHK21-Zellen fast keinen Hintergrundwert haben, zeigen die nicht-transfizierten humanen HEK293-Zellen einen Hintergrundwert, der jedoch unterhalb des linearen Messbereichs des hCATL-ELISA lag. Dies ist nicht verwunderlich, handelt es sich doch um eine humane Zelllinie, mit endogener Expression von hCATL.

Da der hCATL-*Precursor* normalerweise ins Medium sezerniert wird, wurde hCATL zuvor durch die Immunpräzipitation auch im Medium untersucht (Chauhan et al., 1998). Der Versuch sezernierte hCATL im Medium durch den ELISA zu quantifizieren, schlag fehl, da die Werte unterhalb des messbaren linearen Bereichs lagen. Deswegen wurde die hCATL-Expression in weiteren Versuchen nur im Zelllysate bestimmt (Abb. 10A und B).

Um die Werte auf unterschiedliche Transfektionseffizienz zu normieren, wurden die Zellen gleichzeitig mit dem Reportergen-Plasmid pd2EGFP-N1 kotransfiziert. Die Expression des Reportergens konnte mit einem Fluorimeter (Perkin-Elmer) quantifiziert werden (siehe Punkt 3.10.4, Methoden).

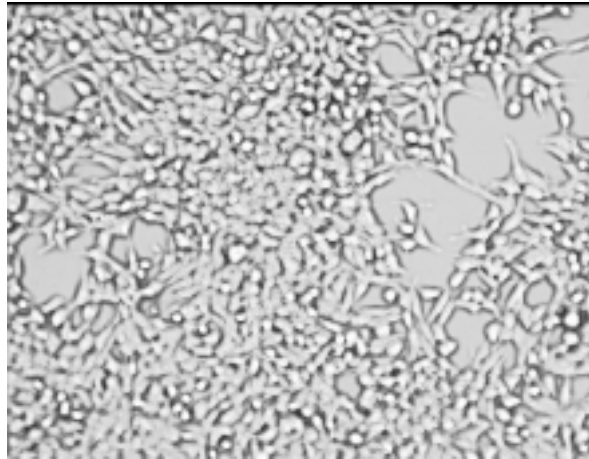
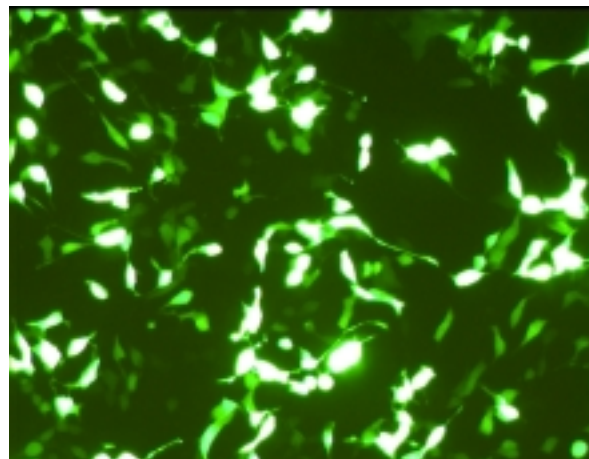
A**B**

Abb. 9 **Transiente Transfektion der HEK293-Zellen mit dem GFP-Reportergenvektor pd2EGFP-N1.**

HEK293-Zellen wurden in der Zelldichte von 5×10^5 in 25 cm²-Kulturflasche ausgesät und 48h später mit dem GFP-Reporterplasmid pd2EGFP-N1 (3 µg je 2 ml Medium) und DOTAP-Transfektionsmittel (Roche) (24 µg je 2 ml Medium) transient transfiziert (siehe Punkt 3.13.2, Methoden). Die Fotoaufnahme erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion am Fluoreszenz-Mikroskop (Zeiss). Sowohl die gesamten Zellen in einer Fläche unter normalem Licht (A) als auch die grün-fluoreszierenden Zellen in der gleichen Fläche wurden dokumentiert.

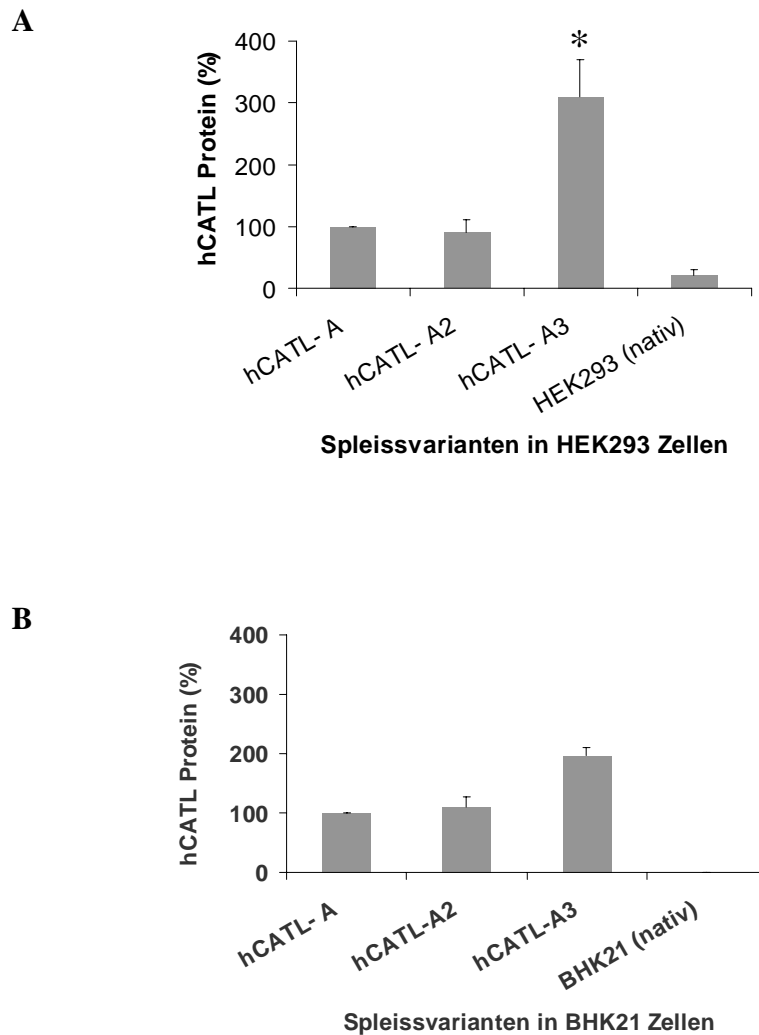


Abb. 10 *In vivo* Expression von hCATL-Protein durch die Spleissvarianten.

HEK293- (A) bzw. BHK21-Zellen (B) wurden durch die pcDNA3.1 (+)-Konstrukte mit den vollständigen hCATL-cDNAs transient transfiziert (siehe Punkt 3.11.2, Methoden). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen geerntet. Der hCATL-Proteingehalt im Zelllysate wurde mittels hCATL-ELISA bestimmt, die Werte der hCATL-A Expression als Referenzwert (100%) gesetzt und die Expression der anderen Varianten darauf bezogen und in Prozent angegeben.

- (A) **Transiente hCATL-Expression in HEK293-Zellen.** Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung). Anzahl der Versuche: n=12; * $p < 0.01$ (Student's t-Test für unpaare Stichproben).
- (B) **Transiente hCATL-Expression in BHK21-Zellen.** Dargestellt sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) von 3 unabhängigen Versuchen.

Von Versuch zu Versuch variierten zwar die Absolut-Werte bei der ELISA-Bestimmung. Jedoch sind die relativen Verhältnisse zwischen den Spleissvarianten beim Vergleich mehrerer Messreihen nahezu konstant. Die Abb. 10A und B zeigen, dass die Spleissvarianten auch *in vivo* mit unterschiedlicher Effizienz translatiert werden. Sowohl in humanen Zellen (HEK293) als auch in nicht-humanen Zellen (BHK21) zeigte die kürzeste Spleissvariante die höchste Expression, und zwar eine bis zu 3 fach höhere Expression im Vergleich zu den anderen beiden (Abb. 10A und B). Dieses Ergebnis des *in vivo* Expressionssystems war konsistent mit den Daten aus den *in vitro* Translationsuntersuchungen und bestätigten nochmals den Wert dieses *in vitro* Translationssystems. Der Versuch, die Expression der hCATL-Spleissvarianten in stabil transfizierten BHK21-Zellen zu bestimmen war erfolglos, da die Expression der hCATL-Varianten unter diesem Umständen zu gering war, um durch den linearen Messbereich des hCATL-ELISAs erfasst zu werden.

4.8. Einfluss der verschiedenen 5'-UTRs von Spleissvarianten auf die Translationseffizienz des Grün-fluoreszierenden Proteins (GFP)

4.8.1. Pilotexperimente für die Expression der Reportergen-Konstrukte

Alle Unterschiede, welche die verschiedenen Spleissvarianten in ihrer Expression aufweisen, können auf Unterschiede in der 5'-UTR zurückgeführt werden. Deswegen wurde im nächsten Schritt untersucht, ob die verschiedenen 5'-UTRs allein in der Lage sind, die Translationsrate eines fremden Leserahmens unterschiedlich zu beeinflussen. Dafür wurden zunächst Konstrukte mit einem heterologen Reportergen hergestellt und in humanen HEK293-Zellen transient exprimiert. Als Reportergen diente in diesem Versuch das d2EGFP (*destabilized Enhanced Green Fluorescent Protein*), welches eine Halbwertszeit von nur 2 Stunden besitzt.

In Vorversuchen erfolgte eine Optimierung der Bedingungen für die GFP-Expression und die Fluoreszenzbestimmung. Zuerst wurde die Zeitabhängigkeit der GFP-Fluoreszenz nach erfolgreicher Transfektion überprüft. Das Ziel war die Ermittlung des Inkubationszeitraumes mit linearem Fluoreszenzanstieg. Dazu wurden die HEK293-Zellen mit dem Vektor pd2EGFP-N1 und dem Transfektionsmittel DOTAP transfiziert, zu bestimmten Zeitpunkten nach der Transfektion geerntet und die GFP-Fluoreszenz im Zelllysat bestimmt. Die Abb. 11 zeigt, dass die GFP-Fluoreszenz 11-12 Stunden nach der Transfektion anfängt linear zu steigen, und diese Linearität noch bis zu 25 Stunden anhält.

Im zweiten Versuch sollte überprüft werden, ob die GFP-Expression von der Zelldichte abhängig ist, da die Zelldichte die Effizienz der Transfektion beeinträchtigen könnte. Somit könnten Unterschiede der Fluoreszenz durch unterschiedliche Zellzahl bedingt sein. Zur Klärung dieser Problems wurden HEK293-Zellen mit verschiedener Zellzahl in 25 cm²-Kulturflaschen ausgesät und mit dem Vektor pd2EGFP-N1 transfiziert. Die Abb. 12 zeigt, dass die GFP-Fluoreszenz bei Zellzahlen von 2-6x 10⁵ Zellen pro Flasche im untersuchten Bereich linear steigt. Oberhalb von 6x 10⁵ Zellen pro Flasche erreichte die Zunahme der Fluoreszenz einen Sättigungswert. Die Absolut-Werte bei den einzelnen Versuchsgruppen waren unterschiedlich, aber die Linearität innerhalb der Gruppe reproduzierbar. Tatsächlich konnte bei einer Zellzahl von 4-6 x 10⁵ pro 25 cm²-Kulturflasche reproduzierbare Werte erzielt werden (Abb. 12).

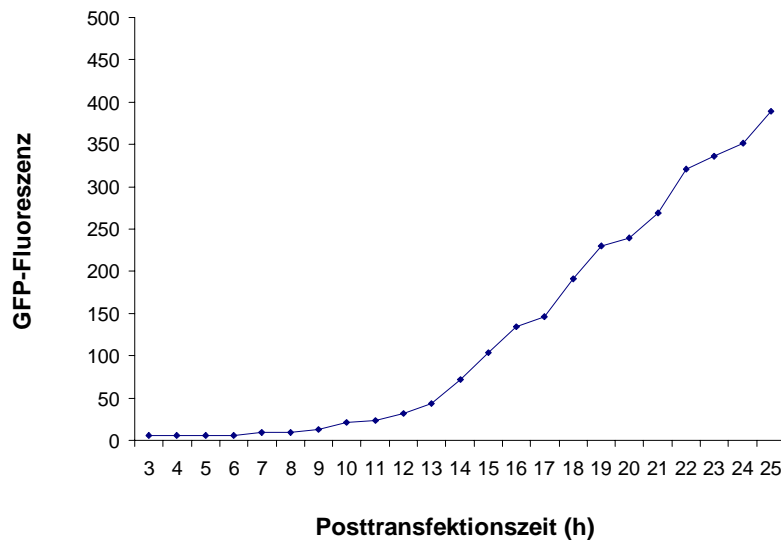


Abb.11 **Abhängigkeit der GFP Expression von der Zeit nach der Transfektion.**

Die HEK293 Zellen wurden mit dem Reporter gen pd2EGFP-N1 Plasmid transient transfiziert und zu den bestimmten Zeitpunkten für die Fluoreszenzbestimmung geerntet. Die Zählung der angegebenen Zeitpunkte begann mit der Inkubation des Transfektionsmittels mit den Zellen zum Zeitpunkt (t=0). Die angegebenen Werte sind Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen.

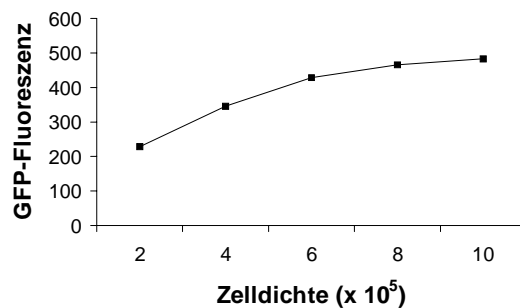


Abb.12 **Abhängigkeit der GFP Expression von der Zelldichte.**

HEK293-Zellen wurden in der angegebenen Zelldichte in 25 cm² Kulturflaschen ausgesät und 48h später mit dem GFP-Reporter gen pd2EGFP-N1 transient transfiziert. Die Zellernte für die Fluoreszenzbestimmung erfolgte 24 Stunden nach der Transfektion. Die Werte sind Mittelwerte von drei unabhängigen Versuchen.

4.8.2. Transiente Expression der d2EGFP-Konstrukte in HEK293-Zellen

Um den Effekt der 5'-UTR der hCATL-Spleissvarianten auf die Translationseffizienz unabhängig von ihren Leserahmen (hCATL) festzustellen, wurden zunächst die drei natürlich vorkommende 5'-UTRs der hCATL-A, -A2 und -A3 „*in frame*“ vor den Leserahmen des Reportergen d2EGFPs eingefügt. Somit wurde der Cathepsin L-Leserahmen durch den d2EGFP-Leserahmen ersetzt (Abb. 13a, b und c).

Mit diesen drei Konstrukten und dem leeren Reporter-Plasmid pd2EGFP-N1 (Abb. 13a, b, c und g) wurden die HEK293-Zellen transient transfiziert. Um die Werte statistisch zu sichern, wurden die Transfektionen unter verschiedenen Bedingungen reproduziert. Dazu wurden 15-20 Transfektionen unabhängig voneinander durchgeführt. Zusätzlich wurden auch verschiedene Transfektionsmittel und Plasmid-Präparationen eingesetzt. Dabei variierten zwar die Werte der Fluoreszenzbestimmung von Transfektion zu Transfektion. Die Verhältnisse zwischen verschiedenen Absolutwerten aus einem Versuch blieben jedoch konstant und liessen sich statistisch gut berechnen. Die Werte des d2EGFP-Konstruktes mit der 5'-UTR der hCATL-A wurde als Referenz (100%) definiert und die anderen Werte darauf bezogen.

In Abb. 14 sind die Mittelwerte (\pm Standardabweichung) von 15 Versuchen berechnet und dargestellt. Die 5'-UTRs der Spleissvarianten hCATL-A (a) und hCATL-A3 (c) zeigten signifikant unterschiedliche Reportergen-Expression der entsprechenden Konstrukte (* $p < 0,05$). Die 5'-UTR der kürzesten Variante (hCATL-A3) bewirkte eine bis zu 75% höhere Expression als die anderen beiden Varianten (hCATL-A bzw. -A2).

Das leere Reporterplasmid pd2EGFP-N1 wurde parallel transfiziert, um den Hintergrundsignal des leeren Plasmids (negative Kontrolle) zu überprüfen und um den Effekt der inklonierten 5'-UTR-Fragmente der hCATL-mRNA abzuschätzen. Dabei zeigte das leere Plasmid eine deutlich niedrigere Expression (Hintergrund) gegenüber den anderen Konstrukten. Diese Beobachtung entsprach den Erwartungen und erklärte sich aus der Tatsache, dass das „leere“ Plasmid anstelle einer funktionellen 5'-UTR (der mRNA des Wildtyp-GFPs) nur die „Restriktions-Kassette“ der multiplen Klonierungsstelle (ca. 60 nt) enthält.

Die bisherigen Ergebnisse weisen zusammen mit dem Reportergen Assay darauf hin, dass eine Sequenz, welche in der 5'-UTR von hCATL-A3 mRNA nicht vorhanden ist, zu fehlender und geringerer Effizienz bei der Translation von hCATL-A bzw. -A2 führt.

Um diese Aussage genauer zu überprüfen, wurden weitere d2EGFP-Konstrukte mit diesen fehlenden Teilen hergestellt, welche die angegebenen Abschnitte von Nukleotid 132 bis zum Ende des Exon 1 vor dem Leserahmen des d2EGFP enthielten (Abb. 13d, e und f). Die Analyse zeigte, dass die Expression des Konstruktes mit Nukleotiden 132-188 (Abb. 13f) aus Exon 1 signifikant niedriger war (Abb. 14f). Hingegen konnte das Konstrukt mit Nukleotiden 188-278 aus Exon 1 (Abb. 13e) eine Reportergen-Expression erzielen, die signifikant höher war als die des Referenz-Konstruktes (Abb. 14e). Daraus kann geschlossen werden, dass in diesem Bereich zwischen Nukleotid 132 und 188 ein *cis*-agierendes Sequenz-Element vorhanden sein könnte, welches die Translation negativ beeinflusst.

Parallel zu den Fluoreszenzbestimmungen erfolgte auch die Analyse der GFP-mRNA durch Northern Blot. Hierzu wurde Gesamt-RNA auf eine Nylonmembran transferiert. Die Membranen

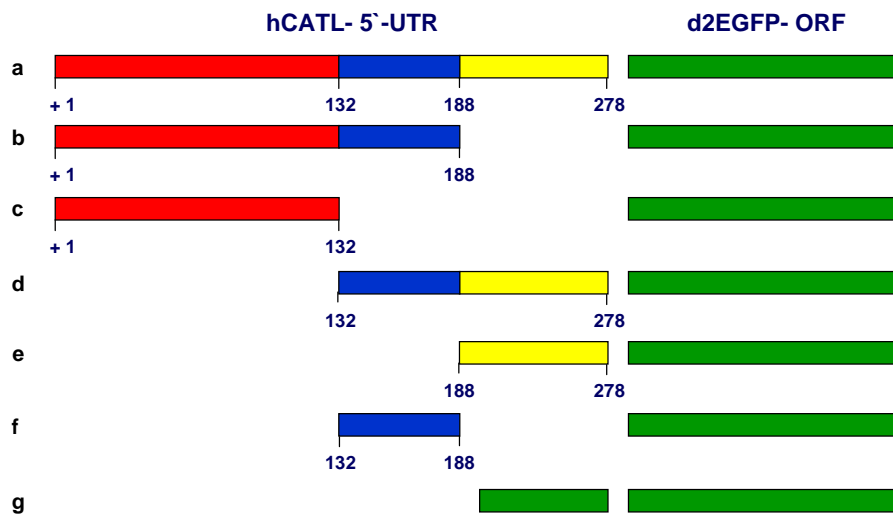


Abb. 13 Die pd2EGFP-Konstrukte für die Charakterisierung der verschiedenen 5'-UTRs der hCATL-Spleissvarianten.

Die 5'-UTRs der Spleissvarianten wurden entweder vollständig (a, b und c) oder teilweise (d, e und f) vor dem Leserahmen des GFP-Reportergenens von der Vektor pd2EGFP-N1 eingeführt. Folgende Fragmente dienten als 5'-UTR für das d2EGFP-Reportergen:

- (a) Die gesamte 5'-UTR der längsten Form hCATL-A. Dies entspricht dem gesamten Exon 1 des hCATL.
- (b) Die gesamte 5'-UTR der mittleren Form hCATL-A2. Dies entspricht den Nukleotiden 1-188 des Exon 1.
- (c) Die gesamte 5'-UTR der kürzesten Form hCATL-A3. Dies entspricht den Nukleotiden 1-132 des Exon 1.
- (d) Nukleotide 133-278 des Exon 1, welche bei der Form hCATL-A3 gegenüber der Form hCATL-A fehlen.
- (e) Nukleotide 188-278 des Exon 1, welche bei der Form hCATL-A2 gegenüber der Form hCATL-A fehlen.
- (f) Nukleotide 133-188 des Exon 1, welche bei der Form hCATL-A3 gegenüber der Form hCATL-A fehlen.
- (g) Die multiplen Klonierungsstelle (ca. 60 nt) im Vektor pd2EGFP-N1 als Kontrolle.

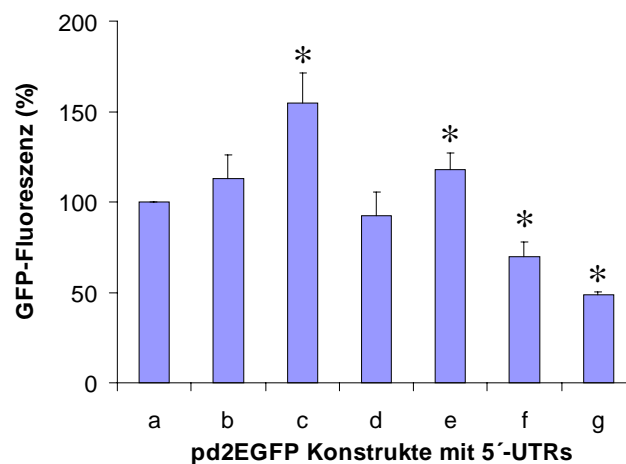


Abb. 14 Transiente Expression der d2EGFP-Reporterkonstrukte mit den 5'-UTRs der hCATL-Spleissvarianten.

Die 5'-UTR-pd2EGFP-N1 Reporter-gen-Konstrukte, wie in Abb. 13 beschrieben, wurden in HEK293-Zellen transient exprimiert. Die GFP-Fluoreszenzbestimmung erfolgte im Zelllysate. Die Fluoreszenzwerte des hCATL-A 5'-UTR-Konstruktes (a) wurde als Referenzwert (100%) gesetzt und alle andere Messwerte eines Versuchs wurden darauf bezogen und in Prozent angegeben. Die Reihenfolge von „a“ bis „g“ entspricht den in Abb. 13. Dargestellt sind Mittelwerte \pm Standardabweichung (Anzahl der Versuche: n=15) * $p < 0.05$ (Student's t-Test für unpaare Stichproben).

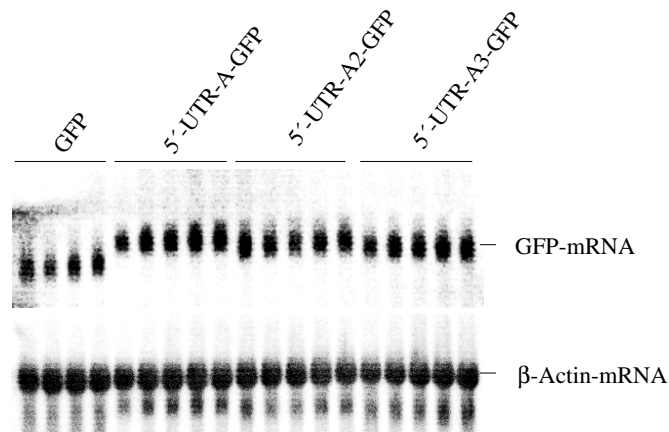


Abb. 15 Bestimmung des GFP-mRNA Gehalts durch Northern Blot.

HEK293-Zellen wurden durch die Reporter-gen pd2EGFP-N1 Konstrukte mit den 5'-UTRs der hCATL-A, -A2 und -A3 sowie dem leeren Plasmid allein transient transfiziert (siehe a,b,c, und g in Abb. 13). 24 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen für die Isolierung der Gesamt-RNA und die Bestimmung der GFP-Fluoreszenz geerntet. Die GFP-mRNA in den Gesamt-RNAs wurde durch Northern Blot mit einer GFP-spezifischen cDNA-Sonde analysiert (siehe Punkt 3.13.5, Methoden). Die Werte wurden durch die Hybridisierung mit der β -Actin spezifischen cDNA-Sonde normiert. Die Spuren, die den entsprechenden Reporter-gen-Konstrukte gehören, sind angezeigt.

wurden mit einer GFP-spezifischen und radioaktiv markierten cDNA-Sonde hybridisiert und am Phosphoimager ausgewertet. Die Werte für GFP-mRNA wurde durch sukzessive Hybridisierung mit der β -Actin spezifischen cDNA-Sonde normiert. Diese Analyse zeigte, dass kein Unterschied zwischen der mRNA-Konzentration verschiedener Konstrukte bestand. Beobachtung zeigte abschliessend, dass die unterschiedliche Expression des GFP-Proteins nicht auf Unterschiede in der Transkription sondern tatsächlich auf die unterschiedliche Translation zurückzuführen war. Dieses Experiment bestätigte nochmals die Bedeutung der 5'-UTRs der hCATL-Spleissvarianten für die Translationseffizienz und damit die Genexpression.

5. Diskussion

5.1. Alternatives Spleissen des hCATL-Transkripts

5.1.1. Identifizierung der neuen Spleissvariante der hCATL-mRNA

Bisherige Kenntnisse durch Slot-Blot bzw. RT-PCR sprechen dafür, dass verschiedene Spleissvarianten der hCATL-mRNA in den meisten Geweben und Zellen ubiquitär vorkommen, zumindest in den Geweben, aus denen diese Varianten kloniert waren (Chauhan et al., 1991; Rescheleit et al., 1996). Die hCATL-A und hCATL-B mRNAs waren einzeln aus zwei unterschiedlichen cDNA-Banken selektioniert und kloniert worden (siehe Abb. 1A) (Gal et al., 1988; Joseph et al., 1988). Warum es keiner der beiden Arbeitsgruppen gelang, die hCATL-A und -B cDNAs zusammen zu isolieren, blieb ungeklärt. Zwei weitere Formen der hCATL-mRNA, nämlich hCATL-A1 und -A2, sind als Varianten für hCATL-A mRNA später bekannt geworden (siehe Abb. 1A) (Rescheleit et al., 1996). Bei dieser Klonierung durch RT-PCR war es ebenfalls nicht gelungen, alle Formen der hCATL-mRNA zu gewinnen.

Die Unterschiede der obengenannten mRNA-Formen des hCATL liegen in der 5'-UTR. Die Exon/Intron-Aufteilung wurde zuerst für hCATL-A beschrieben und das alternative Spleissen der anderen Varianten auf diese Form und ihre Exon/Intron-Grenzen bezogen. In allen Varianten sitzt die Translationsstartstelle 13 Nukleotide nach dem 5'-Ende des Exon 2. Das alternative Spleissen findet entweder im Exon 1 oder im Intron 1 statt. In der hCATL-A mRNA bleibt das Exon 1 mit 278 Nukleotiden komplett und das Intron 1 wird entfernt (siehe Abb. 1A) (Gal, et al., 1988). Bei der Entstehung der Form hCATL-B mRNA wird das Exon 1 mit dem grössten Teil des Intron 1 zusammen herausgeschnitten. Deshalb befindet sich kein Teil des Exon 1 in der 5'-UTR von hCATL-B mRNA, sondern nur ein kleiner Teil des Intron 1 (siehe Abb. 1A) (Joseph, et al., 1988). Bei den zwei weiteren alternativen Formen hCATL-A1 und -A2 mRNA findet das alternative Spleissen ausschliesslich im Exon 1 statt. Durch das alternative Spleissen am 3'-Ende ist das Exon 1 von 278 Nukleotiden (hCATL-A) auf 253 bzw. 188 Nukleotide (hCATL-A1 bzw. -A2) verkürzt worden (siehe Abb. 1A) (Rescheleit et al., 1996).

Aus dem obengenannten Vergleich der Spleissvarianten wird klar, dass die hCATL-A, -A1, -A2 mRNAs eine gemeinsame Sequenz am 5'- bzw. 3'-Ende haben mussten. Um sämtliche cDNAs aller hCATL-Transkripte durch RT-PCR zu amplifizieren und zu klonieren wurden in der vorliegenden Arbeit spezifische Primerpaare nach den bekannten Sequenzdaten der hCATL-A bzw. hCATL-B mRNA aus der Genbank entworfen.

Auf diese Weise konnten die vollständigen cDNAs der beiden bekannten hCATL-A und -A2 kloniert werden. Ein neues und *in vivo* auch als dominierend erkanntes Fragment konnte auf dem Agarosegel beobachtet werden. Durch die Klonierung und Sequenzierung wurde dieses als Spleissvariante identifiziert und als hCATL-A3 bezeichnet. Es handelte sich um eine bisher noch unbekannte und besonders kurze Spleissvariante der hCATL-mRNA. Im Vergleich zu den Varianten hCATL-A bzw. hCATL-A2 mRNA wurde dabei das Exon 1 durch alternatives Spleissen auf 132 Nukleotide verkürzt.

Im Verlauf dieser Untersuchung gelang es nicht, die mRNA der hCATL-A1 als vollständiges cDNA Fragment zu klonieren, obwohl die eingesetzten Primer für die cDNAs der hCATL-A, -A1, -A2 und -A3 identisch waren. Darüber hinaus konnte trotz aller Versuche weder ein PCR

Produkt noch ein cDNA Fragment für die hCATL-B gewonnen werden. Es ist bislang ungeklärt, ob diese Variante hCATL-B (Joseph et al., 1988) eventuel ein Artefakt ist. Die Tatsache, dass die cDNAs der Varianten hCATL-A und -B nur unabhängig voneinander aus verschiedenen cDNA-Banken kloniert werden konnten, obwohl die eingesetzten Sonden für die beiden cDNAs identisch waren, spricht jedoch schon dafür, dass hCATL-B einen Artefakt darstellt.

Deswegen ist es wahrscheinlich, dass nur die Formen hCATL-A, -A2 und -A3 natürlich vorkommen. Diese Vermutung wird ebenfalls durch die Sequenzanalyse der 5'-UTR des hCATL-Gens und der resultierenden Identifizierung potenzieller Spleissstellen unterstützt: ein alternatives Spleissen der hCATL-Transkripte kann demzufolge aus der Sequenz des hCATL-Gens angenommen werden (siehe Punkt 4.1, Abb. 1B). Das Exon 1 enthält dreimal die AG/GU Sequenz, die als Konsensus-Sequenz für eine 5'-Spleissstelle bzw. für eine Exon/Intron-Verbindungsstelle bezeichnet wird (Krauss, 2000; Seraphin et al., 1989; Siliciano et al., 1988; Zhuang et al., 1986). Die drei Sequenzen in Exon 1 befinden sich genau an den Stellen, wo ein alternatives Spleissen für hCATL-A bzw. hCATL-A2 mRNA sowie für die neue Spezies hCATL-A3 mRNA stattfindet (siehe Abb. 1B). Eine solche AG/GU Konsensus-Sequenz muss zwar nicht unbedingt eine entscheidende Rolle beim alternativen Spleissen spielen, es kann jedoch ebenfalls in ihrer Nähe ein kryptisches Spleiss-Signal für Spleiss-Faktoren geben. Zudem könnten sich mögliche „*Exonic Splice Enhancer*“ in Exon 2 befinden, da bisher bekannte „*Exonic Splice Enhancers*“ normalerweise in einem stromabwärtsliegenden Exon liegen (Selvakumar and Helfman, 1999; Bourgeois et al., 1999). Nach bisherigen Kenntnissen können die antagonistischen Wechselwirkungen zwischen hnRNP A/B und SR-Proteinen durch die kryptischen Spleissstellen in Exon 1 bzw. in Intron 1 sowie durch die möglichen „*Splice Enhancers*“ in Exon 2 des hCATL zu einem alternativen Spleissen führen. Dabei könnten neben der „*normalen*“ bzw. „*distalen*“ 5'-Spleissstelle (wie z.B. für die Variante hCATL-A) auch „*proximale*“ 5'-Spleissstellen (für die Variante hCATL-A2 bzw. A3) in Exon 1 erkannt und benutzt werden (Caceres und Krainer, 1997; van Oordt et al., 2000; siehe auch Punkt 1.3.3, Einleitung).

5.1.2. RACE-PCR zur Aufklärung der 5'- und 3'-mRNA-Enden

Bisher gab es keine Untersuchung darüber, ob die 5'- bzw. 3'-Enden der bekannten hCATL-cDNAs mit der Transkriptionsstartstelle bzw. dem poly(A)-Schwanz des hCATL-Gens identisch waren, da die Enden des hCATL-Transkripts bisher noch nicht mit hCATL-spezifischen Primern oder Sequenzen weiter verfolgt wurden. Zu diesem Zweck werden häufig Methoden wie RACE-PCR, Primer Extensio Assay oder auch RNase Protection Assay eingesetzt. In der vorliegenden Arbeit wurde die 5'- bzw. 3'-RACE-PCR benutzt, um alle 5'- bzw. 3'-UTR der hCATL-Transkripte mit einem identischem Ansatz an genspezifischen Primern zu gewinnen und zu analysieren.

Die bisher bekannten hCATL-cDNAs sind in ihrem Leserahmen, der die Exons 2-7 beinhaltet, identisch. Deshalb war es möglich, genspezifische antisense Primer aus Exon 2 für 5'-RACE-PCR abzuleiten und alle 5'-UTRs der hCATL-mRNA's gemeinsam zu amplifizieren. Aufgrund der Grösse der 5'-RACE-PCR Fragmente (siehe Abb. 2B) und der Sequenzanalyse konnte gezeigt werden, dass die Transkriptionsstartstelle für hCATL in den Spezies hCATL-A, -A2 und -A3 übereinstimmen. Damit wurde die Vollständigkeit unserer cDNA-Klone für das jeweilige 5'-Ende bewiesen. Das Vorhandensein eines gemeinsamen Transkriptionsstartes lässt auch darauf schliessen, dass für das Entstehen der beobachteten hCATL-mRNA-Variante nicht

unterschiedliche Promotoren aktiviert werden, sondern dass posttranskriptionelle Mechanismen, wie das alternative Spleissen hierfür anzunehmen sind.

Darüber hinaus konnten noch zusätzlich zwei neue Fragmente identifiziert werden, die zwar identische Sequenzen zum Exon 1 besitzen, aber am 5'-Ende auf jeweils 240 bzw. 190 Nukleotide verkürzt sind. Es ist unwahrscheinlich, dass diese beiden Fragmente durch eine unzureichende Amplifizierung der PCR entstanden waren, da die Sequenzierung dieser Fragmente zeigte, dass die 5'-Enden dieser Fragmente mit der Cytidin-Markierung [poly(C)-Schwanz] durch die *Terminal-deoxynukleotidyl-Transferase* abgeschlossen waren. Das bedeutet, dass diese Fragmente bei 5'-RACE-PCR bis zum 5'-Enden amplifiziert wurden.

Die Frage stellt sich, wodurch diese beiden Fragmente entstehen? Ein alternatives Spleissen kommt dabei nicht in Frage, da die Unterschiede am 5'-Ende des ersten Exon (5'-UTR) liegen, vorausgesetzt, dass die Angaben über die Exon-Intron Verhältnisse des hCATL-Gens stimmen, d.h. vor dem bekannten Exon 1 keine weitere Intron-Sequenz vorhanden ist. Eine Möglichkeit wäre, dass eine alternative Stellen für den Transkriptionsstart im hCATL-Gen vorhanden ist, wie es bei der Regulation anderer Gene gezeigt wurde, bei denen alternative Promotoren aktiviert werden (Brewer, 1999; Huang et al., 1999; Aizencang et al., 2000; Kawakubo and Samuel, 2000). Dafür muss die 5'-flankierende Sequenz des hCATL-Gens kloniert und untersucht werden. Eine weitere Möglichkeit könnte sein, dass die beiden Fragmente zufällig durch den Abbau des hCATL-Transkripts durch Endonukleasen entstehen. Bei der 5'-RACE-PCR war die Grösse der beiden fraglichen Fragmente (240 bzw. 190 Nukleotide) nicht sehr verschieden von den bekannten Spleissvarianten hCATL-A bzw. -A2 (278 bzw. 190 Nukleotide), wenn die PCR Fragmente auf dem Agarosegel direkt beobachtet wurden (siehe Abb. 2B). Daher konnte durch RACE-PCR nicht abgeschätzt werden, wieviel von diesen beiden „Formen“ in der Gesamt-RNA vorhanden ist. Ein quantitativer Vergleich war aber durch RNase Protection Assay möglich, da diese Fragmente komplementäre Bereiche zu der eingesetzten Sonde besitzen (siehe Punkt 4.4 und Abb. 6). Tatsächlich konnte eine schwache Bande beobachtet werden, die in der Grösse dem Fragment von 240 Nukleotide entsprach. Die andere Bande, die dem Fragment von 190 Nukleotiden entsprach, konnte der Grösse nach auch die bekannte Form hCATL-A2 sein (siehe Punkt 4.4 und Abb. 6A).

Um die 3'-Enden der hCATL-Transkripte zu detektieren, wurde die 3'-RACE-PCR durchgeführt. Dabei wurden zwei sense Primer in Exon 5 bzw. Exon 6 des hCATL eingesetzt, da die cDNA Sequenzen der hCATL-Varianten im Bereich von Exon 2 bis 7 identisch waren (siehe Punkt 4.2 und Abb. 3A). Durch *nested* -PCR wurden drei PCR-Fragmente amplifiziert (siehe Punkt 4.2 und Abb. 3B). Ein ungefähr 1000 nt Fragment war der Sequenz nach mit der 3'-UTR Sequenz der drei Spleissvarianten hCATL-A, -A2 und -A3 identisch. Die anderen zwei kürzeren Fragmente zeigten identische Sequenzen mit den Primern, aber keinen Homologiebereich mit der Sequenz der hCATL-mRNA und resultierten wahrscheinlich aus unspezifischen Primerbindungen. Daher konnten weitere Variationen in der 3'-UTR der hCATL-Transkripte ausgeschlossen werden. Darüber hinaus wurde kein zusätzliches PCR Fragment für die hCATL-B mRNA amplifiziert, obwohl letztere sich in der 3'-UTR von der hCATL-A mRNA unterscheiden sollte (Chauhan et al, 1991). Auch dieser Befund spricht dafür, dass hCATL-B einen Artefakt darstellt.

5.2. Verteilung der hCATL-Spleissvarianten in verschiedenen Geweben und Zellen durch RT-PCR und RNase Protection Assay

Durch die Klonierung und Sequenzierung sowie durch RACE-PCR wurde klar, dass nicht alle beschriebenen Spleissvarianten der hCATL-mRNA wieder zu gewinnen waren. Jedoch war es sicher, dass die drei Spleissvarianten hCATL-A, -A2 und -A3 zumindest in der Gesamt-RNA vorhanden sein konnten. Um die Verteilung der Spleissvarianten in einem relativ grossen Gewebe-Spektrum zu untersuchen, wurde zunächst RT-PCR verwendet, denn diese Methode ist auch bei geringen RNA-Mengen einsetzbar. Dabei wurden verschiedene Primerpaare getestet, um die Spleissvarianten gemeinsam zu amplifizieren und die Grösse der PCR-Produkte zwischen 300 und 600 Nukleotiden zu beschränken. Die RT-PCR bestätigte, dass drei bis vier Fragmente mit dem eingesetzten Primerpaar (siehe Abb. 4A) parallel amplifiziert werden konnten, die ihrer Grösse nach den hCATL-A, -A2 und -A3 entsprachen (siehe Punkt 4.3 und Abb. 4B, C und D). Das legte die Schlussfolgerung nahe, dass die Primerbindungssequenzen ausserhalb des alternativen Spleissignal liegen (siehe Punkt 4.3 und Abb. 4A). Durch die Sequenzanalyse dieser PCR-Produkte wurde auch bestätigt, dass drei von den vier PCR-Fragmenten tatsächlich die Spleissvarianten repräsentieren. Die RT-PCR-Analyse über die Verteilung der Spleissvarianten (siehe Punkt 4.3 und Abb. 4B, C, D) konnte in erster Linie zeigen, dass die drei Spleissvarianten in den meisten untersuchten Geweben und Zellen vorkommen, und dass die neue Spezies hCATL-A3 eine dominierende Spleissvariante in allen untersuchten Geweben war.

Die PCR Fragmente wurden nicht quantitativ ausgewertet, da die grösseren Fragmente, die den hCATL-A und -A2 entsprechen, aus den meisten Geweben wie z.B. aus der Magen- und Duodenumschleimhaut, Haut und Brustgewebe sowie aus manchen Nierengeweben sehr schwach amplifiziert waren (siehe Abb. 4C und D). Zwar konnte nach Intensität der drei Banden grob abgeschätzt werden, dass die kürzeste Spleissvariante in den Geweben und Zellen dominiert, aber eine solche Quantifizierung könnte jedoch zu einer falschen Aussage führen, da ein PCR-Fragment durch unspezifische Primerbindung aus einem anderen Gen stammen könnte.

Eine semi-quantitative Bewertung ist jedoch erforderlich, um zu klären, wie die verschiedenen Spleissvarianten in den Geweben und Zellen verteilt sind. Eine unterschiedliche Verteilung der mRNA-Formen in Geweben könnte Hinweise darauf geben, ob die Genexpression durch alternatives Spleissen reguliert wird (Kraaij et al., 1998; Kone and Higham, 1998; Hofmann et al., 2000).

Deswegen wurde hier ein RNase Protection Assay als weiteres Nachweissystem verwendet. Für die Sonde des RNase Protection Assays, deren Sequenz dem gesamten Exon 1 (278 Nukleotide) des hCATL-Gens entsprach, wurde eine Datenbankrecherche durchgeführt. Diese zeigte, dass in der Genbank keine bekannte humane cDNA vorhanden war, die einen Homologiebereich von ungefähr 20 Nukleotiden überschreitet. Die Ergebnisse des RNase Protection Assays zeigten deutlich, dass drei Fragmente durch die antisense RNA-Sonde vor RNase-Verdau geschützt wurden, die in der Grösse den hCATL-Spleissvarianten entsprachen (siehe Punkt 4.4 und Abb. 5). Das bedeutet, dass diese drei Spleissvarianten auch *in vivo* vorkommen und tatsächlich keine Artefakte der RT-PCR sind.

Die erhöhte Expression von hCATL-mRNA und -Protein in den meisten Tumoren gegenüber normalem Gewebe sind miteinander positiv korreliert. Eine Ausnahme bildet die Niere. Trotz hoher mRNA-Konzentration ist hCATL-Protein und Cathepsin L-Aktivität in Nierentumoren

gegenüber normalem Nierengewebe nur gering nachweisbar (Kirschke et al., 1997; Chauhan et al., 1993). Die erhöhte Exkretion des hCATL im Urin beim Nierentumor oder im Sputum bei Lungentumor könnte eine Erklärung dafür sein. Jedoch widerspricht dies den Befunden bei Kolon- und Leberkarzinomen, da auch diese sekretorischen Organe eine erhöhte hCATL-mRNA und -Proteinexpression bei gleichzeitig erhöhter hCATL-Ausscheidung zeigten. Deshalb stellte sich die Frage nach der Ursache dieser Diskrepanz, und ob die Spleissvarianten der hCATL-mRNA damit zu tun haben könnten.

Über das Missverhältnis zwischen hCATL-mRNA und -Protein in malignen Nierentumoren gegenüber normalem Nierengewebe lässt sich vielfältig spekulieren. Eine Möglichkeit wäre, dass ein Nierentumor ein anderes Verhältnis in der Menge der einzelnen Spleissvarianten haben könnte, als das entsprechende normale Gewebe. Es gibt Berichte über alternatives Spleissen, in denen mRNA-Formen in gewebespezifischen Verhältnissen produziert werden wie z. B. die Phosphodiesterase PDE11A Varianten (Yuasa et al., 2000). Rescheleit et al. (1996) hatten die Spleissvarianten hCATL-A, -A1 und -A2 mRNA durch RT-PCR in Nierentumoren untersucht. Dabei wurde festgestellt, dass die hCATL-A mRNA in normalem Nierengewebe dominiert, während die hCATL-A2 mRNA im Gegenteil in malignen Nierentumoren stärker exprimiert wird als die hCATL-A mRNA. Die Analyse durch RT-PCR und auch durch RNase Protection Assay der vorliegenden Arbeit unterstützen jedoch diese Hypothese nicht (siehe Punkt 4.3-4 und Abb. 4 und 6). Aufgrund der Intensität der einzelnen Banden untereinander, die die Spleissvarianten repräsentieren, ist kein signifikanter Unterschied zwischen dem Nierentumor und normalem Nierengewebe sowie in den anderen Geweben zu beobachten (siehe Tabelle 1).

Eine andere Möglichkeit wäre, dass irgendein Typ der Spleissvarianten der hCATL-mRNA in den Geweben und Zellen transkribiert wird, aber entweder mit sehr niedriger Effizienz oder gar nicht translatiert wird. Diese zweite Möglichkeit könnte für die Expression des hCATL der Fall sein. Deshalb wurde die Analyse bei den Untersuchungen durch RT-PCR und RNase Protection Assay auf die Mengenverhältnisse der einzelnen Spleissvarianten in jedem Gewebe fokussiert. Die Analyse zeigte, dass die kürzeste und neu identifizierte Spleissvariante (hCATL-A3) in allen untersuchten Zellen und Geweben dominiert (siehe Punkt 4.4, Abb. 4, 6 und Tab. 1).

Die zuvor postulierte Überexpression einer weiteren mRNA-Spleissvariante des hCATL-Gens, hCATL-B (Chauhan et al., 1991) konnte in der vorliegenden Untersuchung ausgeschlossen werden. hCATL-B weist identische Sequenzen zu hCATL-A2 und -A3 in der kodierenden Region auf. Beide Spleissvarianten sind jedoch erst kürzlich identifiziert worden (Rescheleit et al., 1996; diese Arbeit) und zeigen, dass die ursprünglich zur Detektion von hCATL-B eingesetzte Sonde auch Fragmente von hCATL-A2 und -A3 im RNase Protection Assay vor RNase-Verdau schützt. Deshalb könnten die damals identifizierten Fragment auch von hCATL-A2 und -A3 stammen. Diese Annahme wird durch die vorliegenden Ergebnisse noch weiter gestärkt, da die Existenz einer individuellen Spleissvariante hCATL-B durch 5'- und 3'-RACE-PCR sowie durch „normale“ RT-PCR nicht bestätigt wurden ((siehe Punkte 4.1-2). Aufgrund dieser neuen Ergebnisse kann geschlossen werden, dass 1) die hCATL-B Spleissvariante aufgrund eines experimentellen Artefaktes entstanden war und 2) die ursprünglich festgestellte Überexpression von hCATL-B in Wirklichkeit durch hCATL-A2 und vor allem durch die überexprimierte Variante hCATL-A3 vorgetäuscht war.

Nach den Ergebnissen in der vorliegenden Arbeit dominiert die kürzeste Spleissvariante hCATL-A3 in allen durch RT-PCR untersuchten Geweben und Zellen (siehe Punkt 4.3 und Abb. 4B, C,

D). Nach der semi-quantitativen Analyse durch RNase Protection Assay ist die Menge der hCATL-A3 mRNA auch bis zu 4-fach erhöht im Vergleich zu den Spleissvarianten hCATL-A und -A2 (siehe Punkt 4.4 und Tab. 1). Da diese kürzeste Spleissvariante hCATL-A3 ein konstantes Verhältnis gegenüber der Variante hCATL-A mRNA aufweist, ist eine Gewebespezifische bzw. unterschiedliche Verteilung dieser Varianten in den untersuchten Geweben und Zellen unwahrscheinlich (Tabelle 1).

Die Existenz von drei zusätzlichen Fragmenten durften beim RNase Protection Assay vermutet werden, da sie aus den hCATL-Transkripten entstehen konnten, die zur eingesetzten antisense RNA-Sonde komplementäre Bereiche besitzen (siehe Punkt 4.4 Abb. 6A). Eines davon ist ungefähr 240 Nukleotide groß und steht zwischen zwei deutlichen Banden von hCATL-A und -A2 mRNA. Diese Bande könnte ihrer Grösse nach dem 240 Nukleotid-Fragment entsprechen, welches durch 5'-RACE-PCR kloniert und sequenziert war. Zusätzlich war ein 190-Nukleotide groß Fragment auch durch 5'-RACE-PCR identifiziert worden (siehe Abb. 2C). Die entsprechende Bande konnte mit der Bande überlappen, die der Spleissvariante hCATL-A2 entsprach (siehe Abb. 6A). Eine dritte schwache Bande, die zwischen den beiden Banden hCATL-A2 und -A3 vorkam, war bisher noch nicht bekannt (siehe Punkt 4.4 und Abb. 6A).

Die Spleissvariante hCATL-A1, die durch Verkürzung des Exon 1 um 27 Nukleotide entstehen sollte (Rescheleit et al., 1996), konnte durch diese Methode ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Da es zudem nicht möglich war, diese mRNA-Variante als vollständige cDNA und auch als 5'-RACE-PCR Produkt zu amplifizieren und zu klonieren, wird hier vermutet, dass diese Variante tatsächlich ein PCR-Artefakt ist.

Durch die vorangegangenen Untersuchungen konnte eine differenzielle Genexpression der hCATL-mRNA-Varianten in verschiedenen Geweben und Zellen ausgeschlossen werden. Deshalb stellt sich die Frage, ob die verschiedenen hCATL-mRNAs unterschiedliche Stabilität aufweisen könnten und dadurch zur unterschiedlichen Proteinexpression beitragen könnten. Dazu wurde eine Analyse der RNA-Stabilität mit Northern Blot durchgeführt.

Da eine Überexpression der Cathepsine für Zellen toxisch sein kann und zur Apoptose führt (Vancompernelle et al., 1998; Ishisaka et al., 1999; van Eijk and de Groot, 1999), wurde die Untersuchung der hCATL-mRNA Stabilität in einem transienten Transfektionsansatz durchgeführt. Die Ergebnisse zeigten (siehe Abb. 7), dass die Halbwertszeiten der hCATL-A und -A3 mRNA vergleichbar sind und ungefähr 4 Stunden betragen.

Aus diesen Befunden konnte keine direkte Erklärung für das Missverhältnis zwischen hCATL-Protein und -mRNA in malignen Nierentumoren abgeleitet werden. Eine weitere Ursache für hohe hCATL-mRNA und geringe Proteinexpression in malignen Nierentumoren gegenüber normalem Nierengewebe könnte sein, dass der Zustand der hCATL-mRNA in den Nierentumoren für die Translation ungünstig sein kann. Dabei könnte die mRNA in diesen Tumoren entweder nicht günstig lokalisiert sein oder an einen Nierentumor-spezifischen Translationsrepressor gebunden sein, der die Translation verhindert bzw. hemmt. Es ist bereits für manche Proteine des Zytoskeletts und neuronale Proteine bekannt, dass ihre Expression durch Lokalisation beeinflusst werden kann (Lee and Cole, 2000). Darüber hinaus sind spezifische Sequenzmotive für subzelluläre Lokalisierung von mRNA in den 3'-UTRs von mehreren mRNAs identifiziert und charakterisiert worden (Gavis et al., 1996; Lee et al., 1999; Ainger et al., 1997). Dieses Sequenzmotiv, AUUUA, dessen Funktion bei der subzellulären mRNA-Lokalisierung in

anderen Säugerzellen festgestellt wurde (Jacobs et al., 1996; Deshler et al., 1998), ist zweimal in der 3'-UTR und einmal in der kodierenden Region der hCATL-mRNA vorhanden. Jedoch sind keine *trans*-agierenden Faktoren bekannt, die dieses Lokalisationssignal erkennen oder daran binden. Trotzdem ist es denkbar, dass die Tumorzellen in der Niere solche *trans*-agierenden Faktoren exprimieren könnten. Dadurch könnte die Translation der hCATL-mRNA gestört werden, indem die mRNA im Zytoplasma falsch lokalisiert wird.

5.3. Einfluss der verschiedenen 5'-UTRs der hCATL-Spleissvarianten auf die Translation

Obwohl über die Rolle einiger Spleissvarianten der hCATL-mRNA spekuliert wurde (Chauhan et al., 1993; Rescheleit et al., 1996), ist bisher keine Untersuchung über die Funktion der einzelnen mRNA-Formen durchgeführt worden.

Die bisher identifizierten Spleissvarianten der hCATL-mRNA unterscheiden sich nur in der 5'-UTR. Die 5'-UTR steht während der Translation mit der 3'-UTR durch eIF4G und poly(A)-Bindungsprotein (PABP) sowie durch hnRNP-Proteine K bzw. C in Wechselwirkung (Le et al., 1997; Tarun und Sachs, 1996; Lorenzini et al., 1997). Darüber hinaus gibt es zahlreiche Beweise dafür, dass die 5'-UTR eine eigene Funktion besitzt. Nach dem „*scanning*“ Modell kann die 5'-UTR Sequenzelemente oder eventuell Sekundärstrukturen besitzen, die entweder auf die Stabilität der mRNA eine Auswirkung haben (Theodorakis and Cleveland, 1996; Linz et al., 1997), oder die Translationseffizienz der mRNA beeinflussen können (Goossen et al., 1990; Koloteva et al., 1997; Menotti et al., 1998; Tang and Tseng, 1999; Gray and Wickens, 1998).

Auf der Suche nach funktionellen Unterschieden von verschiedenen Spleissvarianten wurden zuvor zellfreie *in vitro* Translationssysteme und *in vivo* Expression der cDNA eingesetzt. Reporter-gen Assays wurden ebenfalls für die Charakterisierung der 5'-UTR verwendet. Da im Fall der hCATL-mRNA nur drei Spleissvarianten als vollständige cDNA kloniert waren, wurden diese im folgenden mit den erwähnten Methoden auch näher untersucht (siehe Punkt 4.6 bis 4.8).

5.3.1. Unterschiedliche Translationsrate der hCATL-Spleissvarianten *in vitro*

Kaninchen Retikulozytenlysat (*rabbit reticulocyte lysate*, RRL) ist ein einfaches und gut etabliertes zellfreies System für die *in vitro* Translation. In diesem System wird die Transkription mit der Translation kombiniert, indem die Transkription der cDNA durch die Zugabe von T7 RNA-Polymerase eingeleitet wird. Dabei ist eine endogene Kontrolle der Transkription nicht möglich, weil hierfür kein eukaryotisches Transkriptionssystem des RRL benötigt wird. Der Anteil des RRLs im Translationsansatz beträgt ungefähr 54%. Deswegen kann man davon ausgehen, dass im RRL vorhandene Translationsfaktoren eine Rolle ausüben können.

Die Vorteile dieses Systems liegen einerseits darin, dass das Genprodukt gezielt markiert werden kann, und damit die Grösse des Proteins schnell geprüft werden kann. Andererseits ist es durch dieses System auch möglich, die Translationsrate einer mRNA zu prüfen. Solche *in vitro* Translationssysteme werden als schnelle und einfache Methode für die Untersuchungen eingesetzt, in denen nach der Rolle eines Sequenzmotives bei der Translation gesucht wird (Iizuka et al., 1994; Paraskeva et al., 1999).

Für diese *in vitro* Translation wurden die drei cDNAs der hCATL-A, -A2 und -A3 eingesetzt, die vollständig kloniert waren. Die Ergebnisse zeigten die erwartete Grösse des Genproduktes, das der Präproenzym des hCATL (siehe Abb. 8A, grossere Banden) entspricht.

Überraschend war, dass bei diesem System offenbar eine Regulation der Translation beobachtet werden konnte: die cDNA der kürzesten Variante hCATL-A3 ist bei gleichen eingesetzten cDNA-Template-Mengen mindestens zweimal so effizient translatiert worden wie die anderen beiden. Das bedeutet, dass Proteinfaktoren im RRL allein bereits in der Lage sind, die Translation zu regulieren. Solch ein Effekt konnte auch bei den Untersuchungen des *iron response element* (IRE) beobachtet werden (Paraskeva et al., 1999).

Die kleineren und sehr schwachen Banden in Abb. 8A könnten dem hCATL-Proenzym sein, die durch teilweise Abspaltung des Signalpeptids (ca. 17 Aminosäuren) aus der Präproenzym des hCATL entstehen können. Die Abspaltung erfolgt normalerweise im endoplasmatischen Retikulum (ER). Obwohl das Retikulozytenlysat nach Angaben des Herstellers (Promega) keine Membran-Bestandteilen enthält, ist es nicht auszuschliessen, dass in diesem Lysat noch schwache zytosolische Peptidase-Aktivität vorhanden ist, die unspezifisch das Signalpeptid abspaltet.

Das RRL Translationssystem allein ist nicht die ideale Methode, die translationelle Regulation zu untersuchen. Die Ergebnisse der *in vitro* Translationssysteme wurden deshalb in den folgenden *in vivo* Untersuchungen überprüft.

5.3.2. Verschiedene hCATL-Spleissvarianten werden auch *in vivo* mit signifikant unterschiedliche Rate translatiert

Um die Translationsrate der mRNAs der drei Spleissvarianten hCATL-A, -A2 und -A3 *in vivo* zu vergleichen, wurden HEK293- (*human embryonic kidney*) und BHK21-Zellen (*baby hamster kidney*) mit den entsprechenden cDNAs transfiziert.

Bei der stabilen Transfektion der cDNAs in BHK21-Zellen konnten zwar stabile Klone selektiert werden und die mRNA durch sensitive RT-PCR detektiert werden, aber kein Klon synthetisierte ausreichend hCATL-Protein. Das lag sehr wahrscheinlich daran, dass eine Überexpression der lysosomalen Protease hCATL für die Zellen toxisch ist. Es gibt Hinweise dafür, dass die Überexpression der Cathepsine B oder L Apoptose induziert (Vancompernelle et al., 1998; Ishisaka et al., 1999; van Eijk and de Groot, 1999). Darüberhinaus unterscheidet sich die Zahl der integrierten Plasmide von Klon zu Klon stark. Das erfordert bei der quantitativen Auswertung der stabilen Expression die Werte mit einer internen Kontrolle zu normieren, was normalerweise sehr aufwendig ist. Deswegen wurde in den folgenden Untersuchungen die hCATL-Expression nach transients Transfektion analysiert.

Durch transiente Transfektion konnten die cDNAs der hCATL-Spleissvarianten in BHK21- und HEK293-Zellen unter optimierten Bedingungen exprimiert werden. Der hCATL-Proteingehalt im Zelllysat war ausreichend und konnte durch ELISA bestimmt werden. Für eine statistische Absicherung wurden die Transfektionsversuche und ELISA-Bestimmungen mehrmals reproduziert (n=12). Das Verhältnis der Absolutwerte zueinander innerhalb eines Versuches war für die meisten Versuche identisch. Deswegen wurde die Werte der hCATL-A Expression als 100 % definiert und die anderen Werte darauf bezogen.

Die Ergebnisse zeigten deutlich, dass die kürzeste Variante hCATL-A3 mRNA bis zu 3-fach effizienter translatiert wird als die anderen beiden hCATL-A und -A2.

Darüber hinaus war der Unterschied bei der Expression der hCATL-A3 gegenüber hCATL-A und -A2 Variante in HEK293-Zellen grösser als in BHK21-Zellen. Die Vermutung liegt nahe, dass der eventuelle Einfluss *trans*-agierender Faktoren im homologen humanen System (HEK293) grösser zu sein scheint als im heterologen System (BHK21, Hamster) und die höhere Expression in den HEK293-Zellen darauf beruhen könnte.

Eine Strukturanalyse der 5'-UTR der hCATL-A und -A2 mRNA durch ein Computerprogramm „*RNAfold*“ (Zucker und Stiegler, 1981) wurde zuvor beschrieben (Rescheleit et al., 1996). Diese zeigte, dass eine hypothetische „*stem loop*“ Struktur in der 5'-UTR Sequenz der hCATL-A mRNA vorhanden ist, diese aber bei hCATL-A2 fehlt. Diese Struktur sollte demzufolge die Unterschiede bei der Translationsrate zwischen hCATL-A und A2 mRNA erklären können. Die vorliegenden Ergebnisse zeigten jedoch deutlich, dass diese hypothetische sekundäre Struktur keinen Einfluss auf die Translation haben kann, da die Werte von hCATL-A und -A2 identisch waren (siehe Punkte 4.6, 4.7 und Abb. 10).

Aus den Unterschieden der Translationsrate der hCATL-A3 mRNA gegenüber den hCATL-A bzw. -A2 mRNA kann schlussgefolgert werden, dass im Bereich von Nukleotid 132 bis 188 der hCATL-A und -A2 mRNA ein *cis*-agierendes Element vorhanden ist, das die Translation negativ beeinflusst. Dafür musste im nächsten Schritt überprüft werden, ob die Unterschiede in der Translationsrate auf einem individuellen Sequenzmotiv beruhen, oder durch die Länge der 5'-UTR bedingt sind, da die 5'-UTR der hCATL-A3 mRNA mindestens 48 Nukleotide kürzer ist als die der anderen beiden hCATL-A und -A2.

5.3.3. 5'-UTRs aus hCATL-Spleissvarianten bedingen *in vivo* eine unterschiedliche Translationseffizienz des stromabwärtsliegenden heterologen Leserahmens GFP

Die Expression der hCATL-cDNAs in HEK293- bzw. BHK21-Zellen konnte einen klaren Unterschied zwischen den Translationsraten der verschiedenen 5'-UTR-Spleissvarianten aufzeigen. Jedoch war es noch nicht klar, welche Rolle hierbei die eigenen homologen 3'-UTR und die kodierende Region spielten. Sollten die Unterschiede der Translationsrate auch ohne die homologen Gensequenzen auftreten, wäre das ein Hinweis auf einen Regulationsmechanismus, der an der 5'-UTR der hCATL-mRNA wirkt.

Um ihre Funktion bei der Translation festzustellen, wurden die verschiedenen 5'-UTRs allein durch die Expression eines fusionierten heterologen Reportergens untersucht. Dafür wurde als Reportergen d2EGFP verwendet, welches nach der Expression gewöhnlich im Cytosol lokalisiert wird. Während Wildtyp EGFP eine Halbwertszeit von über 24 Stunden hat, hat das modifizierte d2EGFP eine Halbwertszeit von nur 2 Stunden. Diese Destabilisierung ist darauf zurückzuführen, dass ein Teil der C-terminalen Sequenz des EGFP's durch eine Ersatzmutation in der DNA eine PEST Sequenz erhält. Diese PEST-Sequenz kommt in kurzlebigen Proteinen häufig vor und dient als ein Abbau-Signal für Proteasomen (Rechsteiner, 1990). Deshalb kann durch die Verwendung von d2EGFP anstatt EGFP die Aussagekraft des Reportergenassays stark erhöht werden.

Die verschiedenen 5'-UTRs der Spleissvarianten hCATL-A, -A2 und -A3 wurden vor den Leserahmen des d2EGFP's eingefügt und in humanen HEK293-Zellen transient exprimiert. Vorversuche zeigten, dass die Expression des d2EGFP's in den Zellen innerhalb von 24 Stunden

eine Linearität sowohl in Abhängigkeit von der Zeit nach der Transfektion als auch von der Zelldichte aufweist.

Die Expression der verschiedenen Konstrukte in HEK293-Zellen und eine Datenanalyse zeigte, dass die verschiedenen 5'-UTRs unterschiedlichen Einfluss auf die Expression des Reportergens d2EGFP haben und dass die 5'-UTR der kürzesten Variante (hCATL-A3) eine bis zu 75% stärkere Expression des heterologen Reportergens vermittelte als die längste Variante (hCATL-A) (siehe a, b und c in Abb. 13 bzw. Abb. 14). Dies war tatsächlich auf die unterschiedliche Translationseffizienz der heterologen d2EGFP-mRNAs zurückzuführen, da die Analyse der *steady-state* d2EGFP-mRNA durch Northern Blot keinen Unterschied zeigte. Darüber hinaus bestätigte dieses Ergebnis nochmals die Ergebnisse der *in vitro* Translation und *in vivo* Expression der hCATL-cDNA's.

Die Kontrolltransfektion des leeren original Plasmids pd2EGFP-N1 zeigte eine deutlich niedrigere Expression gegenüber den anderen Konstrukten mit der 5'-UTR der hCATL-mRNA. Das war jedoch nicht verwunderlich, weil die 5'-UTR des leeren Plasmids aus Schnittstellen der Restriktionsendonukleasen-Sequenzen besteht und nicht aus funktionellen 5'-UTR einer mRNA.

Diese Unterschiede, welche die Reporterassays demonstrierten, zeigten zudem, dass die 5'-UTRs der hCATL-Spleissvarianten allein in der Lage sind, unabhängig vom hCATL-Leserahmen und der 3'-UTR, die Expression des GFP-Reportergens zu beeinflussen.

Die Frage war nun, welcher Teil der Sequenz der hCATL 5'-UTR dafür verantwortlich sein könnte. Dazu wurden drei weitere d2EGFP-Konstrukte mit den Teilen der 5'-UTR von hCATL-A mRNA hergestellt, die bei den hCATL-A2 bzw. hCATL-A3 mRNA fehlen. Diese Konstrukte wurden wieder in HEK293-Zellen transient exprimiert. Die Analyse zeigte, dass die Unterschiede in der Translationseffizienz nicht durch die Länge der 5'-UTR bedingt waren, sondern auf einem individuellen Sequenzmotiv beruhen könnten. Es ist sehr wahrscheinlich, dass zwischen der Nukleotidsequenz 132 und 188 des Exon 1 bzw. der hCATL-A mRNA ein *cis*-agierendes Sequenzmotiv vorhanden ist, das die Translation von hCATL- bzw. d2EGFP-mRNA negativ beeinflusst (siehe Punkt 4.8 und Abb. 13f, 14f). Diese Aussage wurde durch die Expression der anderen beiden Konstrukten mit Nukleotiden 132-278 bzw. 188-278 aus Exon 1 (Abb. 13d bzw. e) unterstützt, da eine signifikant höhere Expression des Reportergens nicht durch das Konstrukt mit diesem *cis*-agierenden Element (siehe Abb. 13d und Abb. 14d), sondern durch das andere Konstrukt ohne dieses Sequenzelement erzielt werden konnte (siehe Abb. 13e und Abb. 14e).

Der Ausmass der Unterschiede zwischen der Expression der vollständigen cDNAs und der Reporterexpression mit 5'-UTRs sollte ebenfalls berücksichtigt werden: der Unterschied der Translationsrate zwischen vollständigen hCATL-mRNA's war viel höher als der Unterschied der Translationseffizienz der Reporterkonstrukte nur unter Kontrolle der 5'-UTRs der mRNA's. Obwohl der Unterschied der Spleissvarianten in der 5'-UTR liegt, gibt es klare Hinweise dafür, dass die Translation der mRNA durch die Wirkung der 3'-UTR negativ beeinflusst werden kann. Tatsächlich besitzt die hCATL-mRNA in der 3'-UTR und der kodierenden Region einige Kopien von Sequenzmotiven, die die Translation bei anderen Proteinen unterdrücken können (Jacobs et al., 1996; Deshler et al., 1998). Aber wie können diese Elemente (Translationsrepressor) auf die Translation einwirken, wenn alle Spleissvarianten identische 3'-UTR besitzen? Da sich die meisten Aktivitäten für die Translationsinitiation in der 5'-UTR finden, ist es denkbar, dass die Funktion dieser Elemente nur durch Translationsfaktoren vermittelt werden könnte (Jacobson,

1996). Hierfür werden die spezifischen Sequenzen in der 5'-UTR benötigt. Die 3'-UTR kann dabei durch die RNA-Bindungsproteine und Translationsfaktoren mit der 5'-UTR in Wechselwirkung stehen und dadurch zu der translationellen Regulation verschiedener hCATL-mRNAs beitragen. So können die *trans*-agierenden Faktoren durch eine negative Wirkung des Translationsrepressors in der 3'-UTR aktiviert werden und anschliessend in der 5'-UTR an das Sequenzmotiv binden und das "scanning" der kleinen ribosomalen Untereinheit in die Richtung des Startkodons verhindern (Le et al., 1997; Lorenzini et al., 1997).

Die hier gezeigten Untersuchungen zeigen, dass eine Wechselwirkung zwischen spezifischen 5'-UTR Sequenzen (Nukleotide 132-188) und 3'-UTR-Sequenzen zur Regulation der Translationeffizienz der hCATL-mRNA beitragen könnten. Zellspezifische Translationsfaktoren sind an der Ausbildung dieser Wechselwirkung beteiligt und könnten für das beobachtete Missverhältnis zwischen hCATL-mRNA und -Protein in normalen und malignen Nierenzellen verantwortlich sein.

Literaturverzeichnis

- Adams, M. D., D. Z. Rudner and D. C. Rio. (1996) Biochemistry and regulation of pre-mRNA splicing. *Curr. Opin. Cell Biol.* **8**:331-339.
- Ainger K, D. Avossa, A. S. Diana, C. Barry, E. Barbarese and J. H. Carson. (1997) Transport and localization elements in myelin basic protein mRNA. *J Cell Biol.* **138**(5):1077-1087.
- Aizencang, G., C. Solis, D. F. Bishop, C. Warner and R. J. Desnick. (2000) Human uroporphyrinogen-III synthase: genomic organization, alternative promoters, and erythroid-specific expression. *Genomics.* **70**(2):223-231.
- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. Moore, J. G. Seidman, J. A. Smith and K. Struhl. (1994) Current protocols in molecular biology. Wiley & Sons, New York.
- Bai, Y., D. Lee, T. Yu and L. A. Chasin. (1999) Control of 3' splice site choice *in vivo* by ASF/SF2 and hnRNP A1. *Nucleic Acids Res.* **27**(4):1126-34.
- Ban, J., L. Eckhart, W. Weninger, M. Mildner and E. Tschachler. (1998) Identification of human cDNA encoding a novel Bcl-x isoform. *Biochem. Biophys. Res. Com.* **248**(1):147-152.
- Beelman, C. A. and R. Parker. (1995) Degradation of mRNA in eukaryotes. *Cell.* **81**:179-183.
- Birnboim, C und J. Doly. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids. Res.* **7**:1513-1522.
- Black, D. L. (2000) Protein diversity from alternative splicing: a challenge for bioinformatics and post-genome biology. *Cell.* **103**(3):367-370.
- Blencowe, B. J., A. L. Bowman, S. McCracken and E. Rosonina. (1999) SR-related proteins and the processing of messenger RNA precursors. *Biochem. Cell Biol.* **77**:277-291.
- Borman, A. M., P. Le Mercier, M. Girard and K. M. Kean. (1997) Comparison of picarnolviral-IRES driven internal initiation of translation in cultured cells of different origins. *Nucleic Acids Res.* **25**:925-932.
- Bourgeois, C. F., M. Popielarz, G. Hildwein and J. Stevenin. (1999) Identification of a bidirectional splicing enhancer: differential involvement of SR Proteins in 5' or 3' splice site activation. *Mol. Cell. Biol.* **19**(11):7347-7356.
- Bourgeois, P., J. C. Harlin, S. Renouf, I. Goutal, A. Fairand and A. Husson. (1997) Regulation of ergininosuccinate synthetase mRNA level in rat foetal hepatocytes. *Eur. J. Biochem.* **249**:669-674.
- Brewer, A., C. Gove, A. Davies, C. McNulty, D. Barrow, M. Koutsarakis, F. Farsaneh, J. Pizzy, A. Bamford and R. Patient. (1999) The human and mouse GATA-6 genes utilize two promoters and two initiation codons. *J. Biol. Chem.* **274**(53):38004-38016.

- Burd, C. G. and G. Dreyfuss. (1994) RNA binding specificity of hnRNP A1: hnRNP A1 binding sites in pre-mRNA splicing. *EMBO. J.* **13**: 1197-1204.
- Burge, C., T. Tuschl and P. A Sharp. (1999) *RNA World II* (Gestland, R., T. Cech and J. Atkins, eds) pp. 525-560, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
- Cabot, B., M. Blanchette, I. Lapierre and H. La Branche. (1997) An intron element modulating 5' splice site selection in the hnRNP A1 pre-mRNA interacts with hnRNP A1. *Mol. Cell. Biol.* **17(4)**:1776-1786.
- Caceres, J. F. and A. R. Krainer. Mammalian pre-mRNA splicing factors. (1997) In *eukaryotic mRNA Processing: Frontiers in Molecular Biology*: A. R. Krainer, editor. ERL Press, Oxford. 174-212.
- Carlo, T., R. Sierra and S. M. Berget. (2000). A 5' splice site-proximal enhancer binds SF1 and activates exon bridging of a microexon. *Mol. Cell. Biol.* **20(11)**:3988-3995.
- Chan, R. C. and D. L. Black. (1995) Conserved intron elements repress splicing of a neuron-specific c-src exon *in vitro*. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 6377-6385.
- Chauhan, S. S., L. J. Goldstein and M. M. Gottesman. (1991) Expression of cathepsin L in tumors. *Cancer Res.* **15(5)**:1478-1481.
- Chauhan, S. S., N. C. Popescu, D. Ray, R. Fleischmann, M. M. Gottesman and B. R. Troen. (1993) Cloning, genomic organization, and chromosomal localization of human cathepsin L. *J Biol Chem.* **268(2)**:1039-1045.
- Chauhan, S. S., D. Ray, S. E. Kane, M. C. Willingham and M. M. Gottesman. (1998) Involvement of carboxy-terminal amino acids in secretion of human lysosomal protease cathepsin L. *Biochemistry.* **37(23)**:8584-8594.
- Cote, J., M. J. Simard and B. Chabot. (1999). An element in the 5' common exon of the NCAM alternative splicing unit interacts with SR proteins and modulates 5' splice site selection. *Nucleic Acids Res.* **27(12)**:2529-2537.
- Coulter, L. R., M. A. Landrie and T. A. Cooper. (1997). Identification of a new class of exonic splicing enhancers by *in vivo* selection. *Mol. Cell. Biol.* **17(3)**:2143-2150.
- Del Gatto, F. and R. Breathnach. (1995). Exon and intron sequences, respectively, repress and activate splicing of a fibroblast growth factor receptor 2 alternative exon. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 4825-4834.
- Djali, P. K., R. Dimaline and G. J. Dockray. (1998) Novel form of L-aromatic amino acid decarboxylase mRNA in rat antral mucosa. *Exp. Physiol.* **83(5)**:617-727.
- Dominiski, Z. and R. Kole. (1994). Identification of exon sequences involved in splice site selection. *J. Biol. Chem.* **269**: 23590-23596.

- Deshler J. O., M.I. Highett, T. Abramson, B. J. Schnapp. (1998) A highly conserved RNA-binding protein for cytoplasmic mRNA localization in vertebrates. *Curr Biol.* **8(9)**:489-96.
- Dreyfuss, G., M. J. Matunis, S. Pinol-Roma and C. G. Burd. (1993) hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Annu. Rev. Biochem.* **62**:289-321.
- Eperon, I. C., O. V. Makarova, A. Mayeda, S. H. Munroe, J. F. Caceres, D. G. Hayward and A. R. Krainer. (2000) Selection of alternative 5' splice sites: role of U1 snRNP and models for the antagonistic effects of SF2/ASF and hnRNP A1. *Mol Cell Biol.* **20(22)**:8303-8318.
- Foekens, J. A., J. Kos, H. Peters, M. Krasovec, M. Look, N. Cimerman, M. Meijer-van Gelder, S. Henzen-Logmans, W. van Putten and J. G. Klijn. (1998) Prognostic significance of cathepsins B and L in primary human breast cancer. *J Clin Oncol.* **16(3)**:1013-1021.
- Friedrich, B., K. Jung, M. Lein, I. Turk, B. Rudolph, G. Hampel, D. Schnorr and S. A. Loening. (1999) Cathepsins B, H, L and cysteine protease inhibitors in malignant prostate cell lines, primary cultured prostatic cells and prostatic tissue. *Eur. J. Cancer.* **35(1)**:138-144.
- Futterer, J., and T. Hohn. (1996) Translation in plants: rules and exceptions. *Plant Mol Biol.* **32(1-2)**:159-89.
- Gal, S., M. Willingham and M. Gottesman. (1985) Processing and lysosomal localization of a glycoprotein whose secretion is transformation stimulated. *J. Cell Biol.* **100(2)**:535-544.
- Gal, S. and M. M. Gottesman. (1986) The major excreted protein (MEP) of transformed mouse cells and cathepsin L have similar protease specificity. *Biochem Biophys Res Commun.* **139(1)**:156-162.
- Gal, S. and M. M. Gottesman. (1988). Isolation and sequence of a cDNA for human pro-cathepsin L. *Biochem J.* **253(1)**:303-306.
- Gavis E. R., L. Lunsford, S. E. Bergsten and R. Lehmann. (1996) A conserved 90 nucleotide element mediates translational repression of nanos RNA. *Development.* **122(9)**:2791-2800.
- Goossen, B. and M. W. Hentze. (1992) Position is the critical determinant for function of iron-responsive element as translational regulators. *Mol. Cell. Biol.* **12(5)**:1959-1966.
- Gray, N. K. and M. Wickens. (1998) Control of translation initiation in animals. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **14**:399-458.
- Hantschmann, P., S. Beysiegel and R. Kurzl. (1998) Squamous cell carcinoma of the vulva. Expression of tumor proteases cathepsin-D and pro-cathepsin-L. *J. Reprod. Med.* **43(11)**:933-942.
- Harbeck, N., U. Alt, U. Berger, R. Kates, A. Kruger, C. Thomssen, F. Janicke, H. Graeff and M. Schmitt. (2000) Long-term follow-up confirms prognostic impact of PAI-1 and cathepsin D and L in primary breast cancer. *Int. J. Biol. Markers.* **15(1)**:79-83.

- Goossen B, S. W. Caughman, J. B. Harford, R. D. Klausner and M. W. Hentze. (1990) Translational repression by a complex between the iron-responsive element of ferritin mRNA and its specific cytoplasmic binding protein is position-dependent *in vivo*. *EMBO J.* **9(12)**:4127-4133.
- Hershey, J. W., M. B. Mathews and N. Sonenberg. (1996) *Translational Control* (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)
- Herszenyi, L., M. Plebani, P. Carraro, M. De-Paoli, G. Roveroni, R. Cardin, Z. Tulassay, R. Naccarato and F. Farinati. (1999) The role of cysteine and serine proteases in colorectal carcinoma. *Cancer*. **86(7)**:1135-1142.
- Hertel, K. J., K. W. Lynch and T. Manitis. (1997). Common themes in the function of transcription and splicing enhancers. *Curr. Opin. Cell Biol.* **9**:350-357.
- Hoffman, B. E. and P. J. Grabowski. (1992) U1 snRNP targets an essential splicing factor, U2AF65, to the 3' splice site by a network of interactions spanning the exon. *Genes Dev.* **6**:2554-2568.
- Hofmann T, M. Schaefer, G. Schultz and T. Gudermann. (2000) Cloning, expression and subcellular localization of two novel splice variants of mouse transient receptor potential channel 2. *Biochem J.* **351(Pt 1)**:115-22.
- Holcik M, Sonenberg N, Korneluk RG. (2000) Internal ribosome initiation of translation and the control of cell death. *Trends Genet.* **16(10)**:469-73.
- Huang, D., H. Pospiech, T. Kesti and J. E. Syvaoja. (1999) Structural organization and splice variants of the POLE1 gene encoding the catalytic subunit of human DNA polymerase epsilon. *Biochem. J.* **339(3)**:657-665.
- Ishisaka, R., T. Utsumi, T. Kanno, K. Arita, N. Katunuma, J. Akiyama and K. Utsumi. (1999) Participation of a cathepsin L-type protease in the activation of caspase-3. *Cell Struct Funct.* **24(6)**:465-70.
- Iizuka, N., L. Najita, A. Franzusoff and P. Sarnow. (1994) Cap-dependent and cap-independent translation by internal initiation of mRNAs in cell extracts prepared from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.* **14**:7322-7330.
- Ing, N. H. and T. L. Ott. (1999) Estradiol up-regulates estrogen receptor- α messenger ribonucleic acid in sheep endometrium by increasing its stability. *Biol. Reprod.* **60**:134-139.
- Jacobs, D. B., A. M. Mandelin, T. Giordano, I. Xue, J. S. Malter, L. D. Singh, A. K. Snyder and S. P. Singh. (1996) AUUUA-specific mRNA binding proteins in astrocytes. *Life Sci.* **58(23)**:2083-2089.
- Jacobson, A. (1996) Poly(A) metabolism and translation: the closed loop model. In *Translational Control*. J.W.B. Hershey, M.B. Mathews and N. Sonenberg, eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 451-480.

- Jacobson, A. and S. W. Peltz. (1996) Interrelationships of the pathways of mRNA decay and translation in eukaryotic cells. *Annu. Rev. Biochem.* **65**:693-739.
- Joseph, L. J., L. C. Chang, D. Stamenkovich and V. P. Sukhatme. (1988) Complete nucleotide and deduced amino acid sequences of human and murine preprocathepsin L. An abundant transcript induced by transformation of fibroblasts. *J Clin Invest.* **81**(5):1621-1629.
- Kawahara, H., M. Kasahara, A. Nishiyama, K. Ohsumi, T. Goto, T. Kishimoto, Y. Saeki, H. Yokosawa, N. Shimbara, S. Murata, T. Chiba, K. Suzuki and K. Tanaka. Developmentally regulated, alternative splicing of the Rpn10 gene generates multiple forms of 26S proteasomes. (2000). *EMBO J.* **19**(15):4144-4153.
- Kawakubo, K. and C. E. Samuel. (2000) Human RNA-specific adenosine deaminase (ADAR1) gene specifies transcripts that initiate from a constitutively active alternative promoter. *Gene.* **258**(1-2):165-172.
- Keppler D. and B. F. Sloane. (1996) Cathepsin B: multiple enzyme forms from a single gene and their relation to cancer. *Enzyme Protein.* **49**(1-3):94-105.
- Kirschke H, T. Clausen, B. Gohring, D. Gunther, E. Heucke, F. Laube, E. Lowe, H. Neef, H. Papesch, S. Peinze, G. Plehn, U. Rebmann, A. Rinne, R. Rudrich and E. Weber. (1997) Concentrations of lysosomal cysteine proteases are decreased in renal cell carcinoma compared with normal kidney. *J Cancer Res Clin Oncol.* **123**(7): 402-406.
- Kohtz, J. D., S. F. Jamison, C. L. Will, P. Zuo, R. Lührmann, M. A. Garca-Blanco, and J. L. Manley. (1994) Protein-protein interactions and 5'-splice-site recognition in mammalian mRNA precursors. *Nature.* **368**:119-124.
- Koloteva, N., P. P. Müller and J. G. McCarthy. (1997) The position dependence of translational regulation via RNA-RNA and RNA-protein interactions in the 5'- untranslated region of eukaryotic mRNA is a function of the thermodynamic competence of 40S ribosomes in the translational initiation. *J. Biol. Chem.* **272**(26):16531-16539.
- Kone, B. C. and S. C. Higham. (1998) A novel N-terminal splice variant of rat H⁺-K⁺- ATPase alpha2 subunit. Cloning, functional expression, and renal adaptive response to chronic hypokalemia. *J. Biol. Chem.* **273**(5):2543-2552.
- Kotera, J., K. Fujishige, Y. Imai, E. Kawai, H. Michibata, H. Akatsuka, N. Yanaka and K. Omori. (1999) Genomic origin and transcriptional regulation of two variants of cGMP-binding cGMP-specific phosphodiesterases. *Eur. J. Biochem.* **262**(3):866-872.
- Kozak, M. (1986) Influences of mRNA secondary structure on initiation by eukaryotic ribosomes. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA,* **83**:2850-2854.
- Kozak, M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic. Acids. Res.* **15**:8125-8148.
- Kozak, M. (1991) A short leadersequence impairs the fidelity of initiation by eukaryotic ribosomes *in vitro*. *Gene. Expr.* **1**:111-115.

- Kozak, M. (1999) Initiation of translation in prokaryotes and eukaryotes. *Gene*. **234(2)**:187-208.
- Kraaij, R. P. M. Verhoef, J. A. Grootegoed and A. P. Themmen. (1998) Alternative splicing of follicle-stimulating hormone receptor pre-mRNA: cloning and characterization of two alternatively spliced mRNA transcripts. *J. Endocrinol.* **158(1)**:127-136.
- Kramer, A. (1996) The structure and function of proteins involved in mammalian pre-mRNA splicing. *Annu. Rev. Biochem.* **65**, 367-409.
- Krauss, G. (2000) Posttranscriptional regulation of gene expression. In *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*. Krauss, G. (eds). Wiley-VCH Press, pp. 68-83.
- Lah, T., T. Strojnik, N. Levicar, A. Bervar, I. Zajc, G. Pilkington and J. Kos. (2000) Clinical and experimental studies of cysteine cathepsins and their inhibitors in human brain tumors. *Int. J Biol Markers*. **15(1)**:90-93.
- Laterza, O. F., W. R. Hansen, L. Taylor and N. P. Curthoys. (1997) Identification of an mRNA-binding protein and the specific elements that may mediate the pH-responsive induction of renal glutaminase mRNA. *J. Biol. Chem.* **272(36)**:22481-22488.
- Le, H., R. L. Tanguay, M. L. Balasta, C. Wei, K. S. Browning, A. M. Metz, D. J. Goss and D. R. Gallie. (1997) Translation initiation factors eIF-iso4G and eIF-4B interact with the poly(A)-binding protein and increases its RNA binding activity. *J. Biol. Chem.* **272(26)**:16247-16255.
- Lee, J. A. and G. J. Cole. (2000) Localization of transitin mRNA, a nestin-like intermediate filament family member, in chicken radial glia processes. *J Comp Neurol.* **418(4)**:473-483.
- Lee N. S., E. Bertrand and J. Rossi. (1999) mRNA localization signals can enhance the intracellular effectiveness of hammerhead ribozymes. *RNA*. **5(9)**:1200-1209.
- Li, S., Y. L. Ouyang, W. Dong and J. J. Pestka. (1997) Superinduction of IL-2 gene expression by vomitoxin (deoxynivalenol) involves increased mRNA stability. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **147**:331-342.
- Linz, B., N. Koloteva, S. Vasilescu and J. G. McCarthy. (1997) Disruption of ribosomal scanning on the 5'- untranslated region, and not restriction of translational initiation *per se*, modulates the stability of nonaberrant mRNAs in yeast *saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **272(14)**:9131-9140.
- Lopez, A. J. (1998) Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation. *Annu. Rev. Genet.* **32**, 279-305.
- Lorenzini E. C., and I. E. Scheffler. (1997) Co-operation of the 5' and 3' untranslated regions of ornithine decarboxylase mRNA and inhibitory role of its 3' untranslated region in regulating the translational efficiency of hybrid RNA species via cellular factor. *Biochem J.* **326(2)**:361-367.

- Macejak D. G. and P. Sarnow. (1991) Internal initiation of translation mediated by the 5' leader of a cellular mRNA. *Nature*. **353(6339)**:90-94.
- McCarthy, J. E. (1998) Posttranscriptional control of gene expression in yeast. *Microbiol Mol Biol Rev*. **62(4)**:1492-553.
- Madhani, H. D. and Guthrie, C. (1994) Dynamic RNA-RNA interactions in the spliceosome. *Annu. Rev. Genet.* **28**, 1-28.
- Manley, J. and Tacke, R. (1996) SR proteins and splicing control. *Genes Dev*. **10(13)**:1569-1579.
- Mariottini, P., Z. H. Schah, J. M. Toivonen, C. Bagni, J. N. Spelbrink, F. Amaldi and H. T. Jacobs. (1999) Expression of the gene for mitoribosomal protein S12 is controlled in human cells at the levels of transcription, RNA splicing, and translation. *J. Biol. Chem.* **274(45)**:31853-31862.
- Menotti, E., B. R. Henderson and L. C. Kühn. (1998) Translational regulation of mRNAs with distinct IRE sequences by iron regulatory proteins 1 and 2. *J. Biol. Chem.* **273(3)**:1821-1824.
- Merrick, W. C. (1994) Eukaryotic protein synthesis: an *in vitro* analysis. *Microbiol. Rev.* **56**:822-830.
- Moore, M. J., C. C. Query and P. A. Sharp. (1993) Splicing of precursors to mRNA by the spliceosome, p. 303-358. In R. F. Gesteland and J. F. Atkins (ed.), *The RNA world*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N. Y.
- Morris and Geballe. (2000) Upstream open reading frames as regulators of mRNA translation. *Mol Cell Biol*. **20(23)**:8635-42.
- Nikolic, Z., B. Laube, R. Weber, P. Lichter, P. Kioschis, A. Poustka, C. Muelhardt and C. M. Becker. (1998) The human glycine receptor subunit alpha3: GLRA3 gene structure, chromosomal localization, and functional characterization of alternative transcripts. *J. Biol. Chem.* **273(31)**:19708-19714.
- Nilsen, T. W. (1998) RNA-RNA interactions in nuclear pre-mRNA splicing. In Simons, R. W. and Grunberg-Manago, M. (eds), *RNA structure and function*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY., pp. 279-307.
- Norvell, A., R. L. Kelley, K. Wehr and T. Schupbach. (1999) Specific isoforms of squid, a *Drosophila* hnRNP, perform distinct roles in Gurken localization during oogenesis. *Genes Dev*. **13(7)**:864-876.
- Nottrott, S., K. Hartmuth, P. Fabrizio, H. Urlaub, I. Vidovic, R. Ficner and R. Lührmann. (1999) Functional interaction of a novel 15.5 kD [U4•U5•U6] tri-snRNP protein with the 5' stem loop of U4 snRNA. *EMBO J*. **18(21)**: 6119-6133.
- Oliveira CC, McCarthy JE. (1995) The relationship between eukaryotic translation and mRNA stability. A short upstream open reading frame strongly inhibits translational initiation and

- greatly accelerates mRNA degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* **270(15)**:8936-8943.
- Oumard, A., M. Hennecke, H. Hauser and M. Nourbaksh. Translation of mRNA is mediated by highly efficient internal ribosome entry. (2000). *Mol. Cell. Biol.* **20(8)**:2755-2759.
- Pain, V. M. (1996) Initiation of protein synthesis in eukaryotic cells. *Eur. J. Biochem.* **236**: 747-771.
- Paraskeva, E., N. K. Gray, B. Schläger, K. Wehr and M. W. Hentze. (1999) Ribosomal pausing and scanning arrest as mechanisms of translational regulation from cap-distal iron-responsive elements. *Mol. Cell. Biol.* **19(1)**:807-816.
- Park, I. C., S. Y. Lee, D. G. Leon, C. S. Hwang, B. G. Hwang, S. H. Lee, W. S. Hong and S. I. Hong. (1996) Enhanced expression of cathepsin L in metastatic bone tumors. *J. Korean. med. Sci.* **11(2)**:144-148.
- Parker, R., P. G. Siliano and C. Guthrie. (1987) Recognition of the TACTAAC box during splicing in yeast involves base pairing to the U2-like snRNA. *Cell*, **49**:229-239.
- Pelleitier, J. and N. Sonneberg. (1985) Insertion mutagenesis to increase secondary structure within the 5' noncoding region of eukaryotic mRNA reduces translational efficiency. *Cell*, **40**:515-526.
- Preiss, T. and M. W. Hentze. (1998) Dual function of messenger RNA cap structure in poly(A)-tail-promoted translation in yeast. *Nature*, **392**:516-523.
- Prinz, M., U. K. Hanisch, H. Kettenmann and F. Kirchhoff. (1998) Alternative splicing of mouse IL-15 is due to the use of an internal splice site in exon 5. *Brain. Res. Mol. Brain. Res.* **63(1)**:155-162.
- Petersen-Mahrt, S. K., C. Estmer, C. Öhrmalm, D. A. Matthews, W. C. Russell and G. Akusjärvi. (1999) The splicing factor-associated protein, p32, regulates RNA splicing by inhibiting ASF/SF2 RNA binding and phosphorylation. *EMBO J.* **18(4)**: 1014-1024.
- Rescheleit, D. K., W. J. Rommerskirch, B. Wiederanders. (1996) Sequence analysis and distribution of two new human cathepsin L splice variants. *FEBS Lett.* **394(3)**:345-8.
- Robinson, B. L., G. J. Cote and S. M. Berget. (1990) Exon definition may facilitate splice site selection in RNAs with multiple exons. *Mol. Cell. Biol.* **10**: 84-94.
- Rhoads, R. E. (1993) Regulation of eukaryotic protein synthesis by initiation factors. *J. Biol. Chem.* **268**:3017-3020.
- Ruskin, B., P. D. Samure and M. G. Green. (1987) A factor, U2AF, is required for U2 snRNP binding and splicing komplex assembly. *Cell*, **52**:207-219.
- Russo, A., V. Bazan, M. Migliavacca, I. Zanna, C. Tubiolo, F. M. Tumminello, G. Dardanoni, M. Cajozzo, P. Bazan, G. Modica, M. Latteri, R. M. Tomasino, G. Colucci, N. Gebbia and G.

- Geto. (2000) Prognostic significance of DNA ploidy, S-phase fraction, and tissue levels of aspartic, cysteine, serine proteases in operatable gastric carcinoma. *Clin. Cancer Res.* **6(1)**:178-184.
- Sachs, A. B., P. Sarnow and M. W. Hentze. (1997) Starting at the beginning, middle, and end: translation initiation in eukaryotes. *Cell*, **89**:831-838.
- Sachs AB, Varani G. (2000) Eukaryotic translation initiation: there are (at least) two sides to every story. *Nat Struct Biol.* **7(5)**:356-61.
- Schaal, T. and T. Maniatis. (1999) Selection and characterization of pre-mRNA splicing enhancers: identification of novel SR protein-specific enhancer sequences. *Mol. Cell. Biol.* **19(3)**:1705-1719.
- Selvakumar, M. and D. M. Helfman. (1999) Exonic splicing enhancers contributed to the use of both 3' and 5' splice site usage of rat beta-tropomyosin pre-mRNA. *RNA* **5**:378-394.
- Seraphin, B. and M. Rosbash. (1989). Identification of functional U1 snRNA-pre-mRNA complexes committed to spliceosome assembly and splicing. *Cell*, **59**:349-358.
- Siliciano, P. G. and C. Guthrie. (1988) 5' splice site selection in yeast: genetic alterations in base pairing with U1 reveal additional requirements. *Genes Dev.* **2**: 1258-1267.
- Sivaparthi, M., M. Yamamoto, G. L. Nicolson, Z. L. Gokaslan, G. N. Fuller, L. A. Liotta, R. Sawaya and J. S. Rao. (1996) Expression and immunohistochemical localization of cathepsin L during the progression of human gliomas. *Clin. Exp. Metastasis*, **14(1)**:27-34.
- Snyder, P. B., V. A. Florio, K. Ferguson and K. Loughney. (1999) Isolation, expression and analysis of splice variants of a human Ca^{2+} /calmodulin-stimulated phosphodiesterase (PDE1A) *Cell. Signal.* **11(7)**:535-544.
- Shaw, G. and R. Kamen. (1986) A conserved AU sequence from the 3' untranslated region of GM-CSF mRNA mediates selective mRNA degradation. *Cell*. **46(5)**:659-667.
- Staffa, A. and A. Cochrane. (1995) Identification of positive and negative splicing regulatory elements within the terminal *tat-rev* exon of human immunodeficiency virus type 1. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 4597-4605.
- Staknis, D. and R. Reed. (1994) SR proteins promote the first specific recognition of pre-mRNA and are present together with the U1 small nuclear ribonucleoprotein particle in a general splicing enhancer complex. *Mol. Cell. Biol.* **14**: 7670-7682.
- Staley, J. P. and C. Guthrie, (1998) Mechanical devices of the spliceosome: motors, clocks, springs and things. *Cell*, **92**, 315-326.
- Staton, J. M. and P. J. Leedman. (1998) Posttranscriptional regulation of thyrotropin - subunit messenger ribonucleic acid by thyroid hormone in murine thyrotrope tumor cells: a conserved mechanism across species. *Endocrinol.* **139(3)**:1093-1099.

- Strehler, E. E. and D. A. Zacharias. (2001) Role of alternative splicing in generating isoform diversity among plasma membrane calcium pumps. *Physiol Rev.* **81**(1):21-50
- Svineng, G., R. Fässler and S. Johansson. Identification of β 1C-2, a novel variant of the integrin β 1 subunit generated by utilization of an alternative acceptor site in exon C. (1998) *Biochem. J.* **330**:1255-1263.
- Tang, B., M. Wang and B. C. Wise. (1997) Nerve growth factor mRNA stability is controlled by a cis-acting instability determinant in the 3'-untranslated region. *Mol. Brain Res.* **46**:118-126.
- Tang, W., and H. Tseng. (1999) A GC-rich sequence within the 5' untranslated region of human basoonuclin mRNA inhibits its translation. *Gene.* **237**(1):35-44.
- Tarun, S. and A. B. Sachs. (1996) Association of the yeast poly (A) tail binding protein with the translation initiation factor eIF4G. *EMBO J.* **15**:7168-7177.
- Theodorakis, N. G. and D. W. Cleveland. (1996) Translationally coupled degradation of mRNA in eukaryotes. In *Translational Control*. J.W.B. Hershey, M.B. Mathews and N. Sonenberg, eds. (Cold Spring Harbor, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press), pp. 631-653.
- Theil, E. C. (1990) Regulation of ferritin and transferrin receptors. *J. Biol. Chem.* **265**(9):4771-4774.
- Thiele, B. J., M. Berger, A. Huth, I. Reimann, K. Schwarz and H. Thiele. (1999) Tissue-specific translational regulation of alternative rabbit 15-lipoxygenase mRNA differing in their 3'-untranslated regions. *Nucleic Acids. Res.* **27**(8):1828-1836.
- Tian, H. and R. Kole. (1995) Selection of novel exon recognition elements from a pool of random sequences. *Mol. Cell. Biol.* **15**: 6291-6298.
- Tanaka, K., A. Watakabe and Y. Shimura. (1994) Polypurine sequences within a downstream exon function as a splicing factor. *Mol. Cell. Biol.* **14**:1347-1354.
- Thomssen, C., M. Schmitt, L. Goretzki, P. Oppelt, L. Pache, P. Dettmar, F. Janicke and H. Graeff. (1995) Prognostic value of the cysteine proteases cathepsin B and cathepsin L in human breast cancer. *Clin. Cancer Res.* **1**(7):741-746.
- Thomson, A. M., J. T. Rogers and P. J. Leedman. (1999) Iron regulatory element, iron-responsive elements and ferritin mRNA translation. *Int. J. Biochem. & Cell. Biol.* **31**:1139-1152.
- Troen, B. R, D. Ascherman, D. Atlas and M. M. Gottesman. (1988) Cloning and expression of the gene for the major excreted protein of transformed mouse fibroblasts. A secreted lysosomal protease regulated by transformation. *J Biol Chem.* **263**(1):254-61.
- Valcarcel, J. and Green, M. R. (1996) The SR protein family: pleiotropic functions in pre-mRNA splicing. *Trends Biochem. Sci.* **21**:296-301.

- Vancompernelle, K., F. Van Herreweghe, G. Pynaert, M. Van de Craen, K. De Vos, N. Totty, A. Sterling, W. Fiers, P. Vandenabeele and J. Grooten. (1998) Atractyloside-induced release of cathepsin B, a protease with caspase-processing activity. *FEBS Lett.* **438(3)**:150-158.
- van Eijk, M., and C. de Groot. (1999) Germinal center B cell apoptosis requires both caspase and cathepsin activity. *J Immunol.* **163(5)**:2478-2482.
- Van Oordt, W. H. and M. T. Diaz-Meco, J. Lozano, A. R. Krainer, J. Moscat and J. F. Cáceres. The MKK_{3/6}-p38-signaling cascade alters the subcellular distribution of hnRNP A1 and modulates alternative splicing regulation. (2000). *J. Cell. Biol.* **149(2)**:307-316.
- Wang, J. and J. L. Manley. (1997) Regulation of pre-mRNA splicing in metazoa. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **7**, 205-211.
- Wada, M. R., Y. Ohtani, Y. Shibata, K. J. Tanaka, N. Tanimoto and T. Nishikata. (1998) An alternatively spliced gene encoding a Y-box protein showing maternal expression and tissue-specific zygotic expression in the ascidian embryo. *Dev. Growth. Differ.* **40(6)**:631-640.
- Wardrop, S. L. and D. R. Richardson. (1999) The effect of intracellular iron concentration and nitrogen monoxide on Nramp2 expression and non-transferrin-bound iron uptake. *Eur. J. Biochem.* **263(1)**:41-49.
- Watakabe, A., K. Tanaka and Y. Shimura. (1993) The role of exon sequences in splice site selection. *Genes Dev.* **7**: 407-418.
- Wilson, G. M., E. A. Roberts and R. G. Deely. (1997) Modulation of LDL receptor mRNA stability by phorbol esters in human liver cell culture models. *J. Lipid Res.* **38**:437-446.
- Wilson, G. M., Y. Sun, J. Sellers, H. Lu, N. Penkar, G. Dillard and G. Brewer. (1999) Regulation of AUF1 expression via conserved alternatively spliced elements in the 3'untranslated region. *Mol. Cell. Biol.* **19(6)**:4056-4064.
- Will, C. L. and R. Lührmann (1997) snRNP structure and function. In Krainer, A. R (ed.), *Eukaryotic mRNA Processing*. IRL Press at Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 130-173.
- Wu, J. and J. L. Manley. (1989) Mammalian branch site selection by U2 snRNP involves base pairing . *Genes Dev.* **3**: 1553-1561.
- Wu, J. Y. and T. Maniatis. (1993) Specific interactions between proteins implicated in splice site selection and regulated alternative splicing. *Cell*, **75**:1061-1070.
- Xiao, S. H. and J. L. Manley. (1998) Phosphorylation-dephosphorylation differentially affects activities of splicing factor ASF/SF2. *EMBO J.* **17**:6359-6367.
- Yuasa K, J. Kotera, K. Fujishige, H. Michibata, T. Sasaki and K. Omori. (2000) Isolation and characterization of two novel phosphodiesterase PDE11A variants showing unique structure and tissue-specific expression. *J Biol Chem.* **275(40)**:31469-79.

-
- Yoon, H. and T. F. Donahue (1992) Control of translation initiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.* **6**:1413-1419.
- Zahler, A. M., W. S. Lane, J. A. Stolk and M. B. Roth. SR proteins: a conserved family of pre-mRNA splicing factors. (1992) *Genes Dev.* **6**:837-847.
- Zhuang, Y. and A. M. Weiner. (1986) A compensatory base change in U1 snRNA suppresses a 5' splice site mutation. *Cell*, **46**: 827-835.
- Zucker, M. und P. Stiegler. (1981) Optimal computer folding of large RNA sequences using thermodynamics and auxiliary information. *Nucleic Acids Res.* **9**:133-148.

Abkürzungen

cDNA	„complementary“ DNA
cpm	Impuls pro Minute
Ci	Curie
CMV	„cytomegalovirus“
dATP	2'-Deoxyadenosin-5'-triphosphat
dCTP	2'-Deoxycytidin-5'-triphosphat
d2EGFP	„destabilized enhanced green fluorescent protein“
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	„Dulbecco's modified Eagles' Medium“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
DRB	„5,6-chloro-1-β-D-ribofuranosylbenzimidazole“
ELISA	„enzyme-linked immunosorbent assay“
FKS	fötales Kälbeserum
hCATL	humanes Cathepsin L
hnRNP	„heterogeneous nuclear ribonucleoprotein“
IRE	„iron responsive element“
IRES	„internal ribosomal entry site“
IRP	„iron regulatory protein“
Kd	Kilodaltons
kb	Kilobasen
LB	Luria-Broth (Medium)
MEM	„minimal essential medium“
mRNA	„messenger“ RNA
nt	Nukleotid
NTP	Nukleosin-5'-triphosphat
³² P	³² Phosphor
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
poly(A)	poly (Adenosin-5'-Monophosphat)
RACE	„rapid amplification of cDNA ends“
RBP	RNA-Bindungsprotein
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RRL	„rabbit reticulocyte lysate“
rRNA	ribosomale RNA
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
³⁵ S	³⁵ Schwefel
SDS	Natriumdodecylsulfat
snRNA	„small nuclear RNA“
snRNP	„small nuclear ribonucleoprotein particle“
SSC	Natriumchlorid/Natriumcitrat Pufferlösung
uORF	„upstream open reading frame“ (Offene-Leserahmen)
UTP	Uridin-5'-triphosphat
UTR	nicht-translatierte Region
UV	Ultraviolette Licht

Erklärung

Diese Dissertation wurde im Sinne von § 4 (2) der Promotionsordnung von Prof. Dr. B. Wiederanders betreut.

Ehrenwörtliche Versicherung

Ich erkläre, dass

- mir die geltende Prüfungsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät vom 15.11.2000 bekannt ist;
- diese Dissertation nur mit Hilfe der angegebenen Materialien und Literatur angefertigt wurde;
- Prof. B. Wiederanders bei der Anfertigung dieser Promotionsarbeit betreut hat;
- keine unerlaubte dritte Hilfe im Sinne der Promotionsordnung in Anspruch genommen wurde;
- diese Arbeit nur an der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der FSU Jena als Dissertation eingereicht wurde.

Jena, am 20.04.2001

Abulizi Abudula

LEBENS LAUF

Persönliche Daten

Name: Abulizi Abudula
Geburtsdatum: 04. 12. 1963
Geburtsort: Uygur Autonome Region Xinjiang, China
Staatsangehörigkeit : chinesisch
Familienstand: verheiratet

Ausbildung:

1970-1981 Grundschole und Oberschole, anschliessend Gymnasium, Abitur in Turpan, Xinjiang
1981-1983 Chinesischer Sprachkurs an der Hochschule für Minderheiten Beijing.
Abschluss: Sprachzertifikat für Chinesisch (Oberstufe)
1994-1995 Deutscher Sprachkurs an der Tong Ji Universität, Shanghai
Abschluss: Sprachzertifikat für Deutsch (Mittelstufe)

Studium:

1983-1987 Biologiestudium an der Pädagogischen Universität Beijing
Bachelor-Abschluss: 07. 1987
1992-1995 Biochemiestudium an der Universität für Landwirtschaft Xinjiang
1993-1995 Masterarbeit am Institut für Biochemie an der Universität für Landwirtschaft Xinjiang unter Anleitung von Prof. M. Yu.
Thema: Isolierung und Charakterisierung der Cysteinprotease Ficin aus Feige
Master-Abschluss: 08. 1995
seit 01. 1997 Promotion am Institut für Biochemie der Friedrich-Schiller-Universität Jena unter Anleitung von Prof. Dr. Bernd Wiederanders
Thema: Klonierung und molekulare Charakterisierung der Spleissvarianten der humanen Cathepsin L mRNA

Berufstätigkeit:

1987-1992 wissenschaftlicher Mitarbeiter für Biochemie an der Universität für Landwirtschaft Xinjiang (China)

01–11. 1996 wissenschaftlicher Mitarbeiter (Stipendiat) am Institut für Biochemie der Ludwig-Maximilians-Universität München bei PD Dr. Anton Schäffner

Thema: Charakterisierung der Wasserkanal-Proteine PIP1 und PIP2
in Transgenen-Antisense-Pflanzen (*Arabidopsis thaliana*).

Vortrag:

A new variant of human cathepsin L mRNA: tissue distribution, stability and reporter gene analysis. (1999) Winterschool of SFB 469 in Tiers (Ital.)

Veröffentlichungen:

A. Abudula, W. Rommerskirch, D. Günther and B. Wiederanders (2000) 5'-UTR splice variants of human cathepsin L have distinct translational rates. *Biol. Chem.* **381**, S 108

Danksagung

Diese Arbeit entstand unter der wissenschaftlichen Leitung von Herrn Prof. Dr. Bernd Wiederanders im Institut für Biochemie I am Klinikum der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Bei ihm möchte ich mich für die Vergabe des interessanten Themas und die Betreuung sowie für die engagierte Unterstützung bei allen fachlichen und organisatorischen Problemen während dieser Promotionsarbeit bedanken.

Sehr herzlich möchte ich mich bei Herrn Dr. Ekkehard Weber vom Institut für Physiologische Chemie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg bedanken, der mir die Analyse von Cathepsin L-Expression durch ELISA in seinem Labor ermöglicht hat.

Herrn Dr. Winfried Rommerskirch danke ich für seine Einführung in die Anwendung wichtiger gentechnischer Methoden. Bei Gunter Maubach und Stefan Kreusch möchte ich mich ganz herzlich bedanken, da sie mir während meiner Arbeit immer mit wertvollen Tips und Hilfe insbesondere bei der Datenauswertung am PC, zur Verfügung standen.

Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Joachim Clement für seine Einführung in die Methode des RNase-Protection-Assays.

Mein herzlicher Dank gilt Herrn Prof. Karl Nissler, Frau Dr. Inge Wenz, Frau Waltraud Seul, Michaela Köhler und Birgit Schade für ihre Hilfsbereitschaft und freundliche Unterstützung im Isotopenlabor, Zelllabor, Genlabor und Sequenzierlabor. Mein Dank gilt auch Herrn Dr. Schilling, der mir jederzeit die Arbeit am häufig genutzten Fluorimeter ermöglicht hat. Ganz speziell möchte ich mich bei Annett Kreusch und Siebille Papst für ihre ständige Hilfsbereitschaft, Motivierung und häufige sprachliche Hilfe bedanken.

Besonders möchte ich mich bei Herrn Dr. Reinhardt Baier und Herrn Dr. Karl-Heinz Friedrich für ihre Hilfs- und Diskussionsbereitschaft bedanken.

Herrn Dr. Birch-Hirschfeld vom Institut für Virologie der Universität Jena bin ich für schnelle Oligosynthese zu grossem Dank verpflichtet.

Abschliessend danke ich den übrigen Mitarbeitern dieses Instituts, die mich sehr herzlich als Freund aufgenommen und mit denen ich eine schöne Zeit verbracht habe.

Diese Arbeit wurde aus Mitteln der Verbund-Klinische-Forschung (VKF) unterstützt.